# SYNTHESE, CHARAKTERISIERUNG UND SOLUBILISIERUNG VON PORPHYRINSYSTEMEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Peter Seelmann-Eggebert
aus Buenos-Aires

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# SYNTHESE, CHARAKTERISIERUNG UND SOLUBILISIERUNG VON PORPHYRINSYSTEMEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Peter Seelmann-Eggebert
aus Buenos-Aires

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 1983

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. J. Strähle |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Bayer |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. W. Voelter |

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von August 1980 bis Juli 1983 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für sein stetes und wohlwollendes Interesse, das er mir bei der Durchführung dieser Arbeit entgegenbrachte.

When you can measure
something and express it in
numbers, you know something
about it; but when you cannot
measure it, when you cannot
express it in numbers, your
knowledge is of a meagre
and unsatisfactory sort. It
may be the beginning of
knowledge, but you have
scarcely in your thinking
advanced the stage of
science.

Lord Kelvin

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| α | Position "oberhalb" der Porphyrinebene |
| ASA | Aminosäureanalyse |
| β | Position "unterhalb" der Porphyrinebene |
| Boc | tert.-Butyloxycarbonyl |
| c[mol/l] | Konzentration |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCCI | N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPG | 2,3-Diphosphoglycenat |
| E | Extinktion |
| Fp. | Schmelzpunkt |
| h | Stunde |
| HB | Hämoglobin |
| HETP | Höhe eines theoretischen Bodens |
| HOAC | Eisessig |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| HSA | Humanserumalbumin |
| Kp. | Siedepunkt |
| MB | Myoglobin |
| MG | Molekulargewicht |
| -OPCP | Pentachlorphenylester |
| PE(x/y) | Petrolether (Siedebereich x-y°C) |
| $PEG_x$ | Polyethylenglycol (MG: x) |
| prep. LC | präparative Mitteldruck-Flüssigkeits-chromatographie |

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| -suc | Succinyl |
| T [°C] | Temperatur |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TPP | Tetraphenylporphyrin |
| UV/VIS | ultravioletter/sichtbarer Absorptionsbereich |
| Z | Benzyloxycarbonyl |

INHALTSVERZEICHNIS


| | | |
|---|---|---|
| A. | EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG | 1 |
| B. | ALLGEMEINER TEIL | 5 |
| 1. | Hämoglobin | 5 |
| 1.1. | Globin | 6 |
| 1.2. | Hämin | 8 |
| 2. | Modellsubstanzen für Hämoglobin und Myoglobin | 10 |
| 3. | Das "picket-fence"-Porphyrin | 13 |
| 3.1. | Synthese und Atropisomerie | 14 |
| 3.2. | $^1$H-NMR-Untersuchungen an orthosubstituierten Tetraphenylporphyrinderivaten | 20 |
| 3.3. | Reaktion mit Sauerstoff | 27 |
| 3.4. | Reduktion des "picket-fence"-Porphyrins | 33 |
| 3.5. | Ligandeneinflüsse | 33 |
| 3.5.1. | Proximale Liganden | 33 |
| 3.5.2. | Distale Liganden | 36 |
| 3.6. | Einfluß der Konzentration des Liganden und Lösungsmitteleffekte | 38 |
| 3.7. | Ähnliche TPP-Derivate | 40 |
| 3.8. | Weiterentwicklung des "picket-fence"-Porphyrins | 42 |
| 3.9. | Solubilisierung von "picket-fence"-Porphyrin | 43 |
| 3.9.1. | Polymergebundenes "picket-fence"-Porphyrin | 43 |
| 3.9.2. | Solubilisierung mittels Detergentien | 44 |
| 3.9.3. | Solubilisierung mittels Albumin oder Liposomen | 46 |
| 4. | Das "tailed picket-fence"-Porphyrin | 51 |
| 4.1. | Synthese und Trennung mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie | 51 |
| 4.2. | Oxygenierungsverhalten von "tailed picket-fence"-Porphyrinen in wässriger Lösung | 58 |


UNIV. LEIDEN

| | | |
|---|---|---|
| 5. | Präparative Flüssigkeitschromatographie (prep. LC) | 65 |
| 5.1. | Einführung | 65 |
| 5.2. | Anwendung der prep. LC | 66 |
| 5.3. | Säulenqualität bei Verwendung von Kieselgel und "reverse phase"-Material als stationäre Phase | 66 |
| 5.4. | Beschreibung der Anlage | 71 |
| 5.4.1. | Pneumatischer Teil | 73 |
| 5.4.2. | Säule mit beweglichem Stempel | 73 |
| 5.4.3. | Probenbehälter und Eluenstank mit Thermostatisierung | 74 |
| 5.4.4. | Detektor und Fraktionssammler | 74 |
| 5.4.5. | Stationäre Phasen | 74 |
| 5.4.6. | Eluens und Probenlösung | 75 |
| 5.5. | Funktionsweise und Bedienung | 75 |
| 5.5.1. | Packen der Säule | 75 |
| 5.5.2. | Probenaufgabe und Elution | 75 |
| 5.5.3. | Leeren der Säule | 76 |
| C. | EXPERIMENTELLER TEIL | 77 |
| 1. | Allgemeines | 77 |
| 1.1. | Geräte | 77 |
| 1.2. | Chemikalien | 79 |
| 2. | Allgemeine Arbeitsmethoden | 80 |
| 2.1. | Dünnschichtchromatographie | 80 |
| 2.2. | Aminosäureanalysen | 80 |
| 2.3. | Eiseneinbau in "picket-fence"-Porphyrine | 81 |
| 2.3.1. | Bestimmung des Eisengehaltes | 81 |
| 2.4. | Reduktion und Oxygenierungsuntersuchungen an Eisenporphyrinsystemen | 82 |
| 2.4.1. | Reduktion durch einen Dithionit-Kronenetherkomplex | 82 |
| 2.4.2. | Reduktion mit $Pd/H_2$ | 82 |
| 2.4.3. | Heterogene Reduktion | 83 |

2.4.4. Oxygenierungsuntersuchungen an Eisenporphyrinen 83

3. Aminosäurederivate und Peptidsynthesen 84
3.1. Aminosäurederivate 84
3.1.1. TFA-β-Ala-Cl 85
3.2. Synthese des Peptides Z-Leu-His-Leu-OMe 86
3.3. Abspaltung der Schutzgruppen 87
3.3.1. Die Z-Abspaltung 87
3.3.2. Die Boc-Abspaltung 88
3.3.3. Die TFA-Abspaltung 88
3.3.4. Alkalische Verseifung von Methylestern 88

4. Derivate wasserlöslicher Polymere und Proteine
4.1. Funktionalisierung von Dextran 89
4.1.1. Dextran-Carbonat 89
4.1.2. Aminodextran 89
4.2. Synthese von $(H\text{-Leu-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$ 90
4.2.1. $(H\text{-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$ 90
4.2.2. $(H\text{-Leu-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$ 90

5. Porphyrinsynthesen 91
5.1. Bromo[meso-tetra(αααα-ortho-pivaloylamidophenyl)porphyrin]Eisen (III) ("picket-fence"-Porphyrin) 91
5.1.1. meso-Tetra(ortho-nitrophenyl)-porphyrin $H_2TPP(NO_2)_4$ 91
5.1.2. meso-Tetra(orthoaminphenyl)porphyrin $H_2TPP(NH_2)_4$ 91
5.1.3. meso-Tetra(αααα-o-aminophenyl)porphyrin, αααα$H_2TPP(NH_2)_4$ 92
5.1.4. αααα meso-Tetra(orthopivaloylamidophenyl)-porphyrin, αααα $H_2TPP(PIV)_4$ 94
5.1.5. Bromo[meso-tetra(αααα ortho-pyvaloylamidophenyl)porphyrin] Eisen (III) 94
5.2. tailed "picket-fence"-Porphyrin 95

5.2.1. meso-Tri(ααα ortho-pivaloylamidophenyl) mono(α aminophenyl)-porphyrin αααα $H_2$ TPP $PIV_3NH_2$ 95

5.2.2. mesoTri(ααα orthopivaloylamidophenyl)mono (β aminophenyl)porphyrin $H_2TPP(\alpha PIV_3)$ (β $NH_2$) 96

5.2.3. meso-Tri(ααα-orthopivaloylamidophenyl)-mono(β-orthomethoxysuccinylamidophenyl) porphyrin $H_2TPP$ $(\alpha PIV)_3$ (β Suc-OMe) 97

5.2.3.1. Bromo[meso-Tri(ααα-orthopivaloylamido-phenyl)-mono(β-orthomethoxysuccinyl-amidophenyl)-porphyrin] Eisen (III) Fe[TPP$(\alpha PIV)_3$ (β-Suc-OMe)]Br 98

5.2.3.2. Verseifung des Fe[TPP$(\alpha PIV)_3$ (β-Suc-OMe)]Br 98

5.2.4. meso-Tri(ααα-orthopivaloylamidophenyl)-mono(β-orthotrifluoracetyl-β-Alanylamido-phenyl)porphyrin $H_2TPP$ $(\alpha PIV)_3$ (βTFA-βAla) 99

5.2.4.1. Bromo[meso-Tri(ααα-orthopivaloylamido-phenyl)-mono(β-orthotrifluoracetyl-β-Alanyl-amidophenyl)porphyrin)]Eisen (III) Fe[TPP$(\alpha PIV)_3$(β-TFA-βAla)]Br 100

5.2.4.2. Abspaltung der TFA-Schutzgruppe von Fe[TPP$(\alpha PIV)_3$(β-TFA-βAla)]Br 100

6. Kupplung von histidinhaltigen Liganden an "tailed picket-fence"-Porphyrine 101

6.1. Kupplung von H-His(TRT)-OMe X HCl an Fe[TPP$(\alpha PIV)_3$(β-Suc-OH)]Br 101

6.1.1. Verseifung des Methylesters bei Fe[TPP $(\alpha PIV)_3$(βSuc HIS(TRT)-OMe)]Br 102

6.1.2. Abspaltung der Tritylgruppe 102

7. Solubilisierung von Porphyrinsystemen durch Komplexierung 102

7.1. Komplexierung durch Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB) 103

7.2. Komplexierung durch Albumin 103
7.2.1. Vorbereitung des Albumins 103
7.2.2. Komplexierung von Eisenporphyrinen durch Albumin 104

8. Polymer- oder albumingebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin 104
8.1. Dextrangebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin 104
8.2. PEG-gebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin 105
8.3. Albumingebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin 105

D. ZUSAMMENFASSUNG 106

E. LITERATURVERZEICHNIS 108

LEBENSLAUF

## A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Hämproteine gehören zu einer Klasse biologisch wichtiger Makromoleküle, die im Organismus die verschiedensten Aufgaben wahrnehmen. Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb) dienen als Sauerstoff-Transport- bzw. Speicherproteine.Sie übertragen Sauerstoff als Liganden und behalten dabei die Oxidationsstufe ihres Eisen(II)-Porphyrinkomplexes bei, während das Eisenatom in den Cytochromen reversibel zwischen der Fe(II)- und der Fe(III)-Stufe wechselt. Im Unterschied zu Hb und Mb dienen Cytochrome als Elektronenüberträger. Schließlich katalysiert die Peroxidase die Oxidation einer Vielzahl von Substraten durch $H_2O_2$, indem ihr Hämeisen von $Fe^{3+}$ intermediär zum $Fe^{4+}$-Komplex (low spin) überführt wird. In Abbildung 1 wird das Verhalten der Hämproteine schematisch dargestellt (1).

Trotz dieser unterschiedlichen Aufgaben enthalten alle Hämproteine einen Eisenporphyrinkomplex als prostethische Gruppe. Seine Funktionsweise wird durch das Protein bestimmt. Es liegt also nahe, daß die sterische und elektronische Umgebung des Eisenporphyrins die biologische Funktion entscheidend beeinflußt (2).

Bei der Erforschung der Hämproteine finden Myoglobin und Hämoglobin besonderes Interesse und ihre Funktion wird auch mit Hilfe von Modellsubstanzen untersucht.
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Porphyrinsysteme zu synthetisieren und spektroskopisch zu charakterisieren, die als Modellsubstanzen für Hb und Mb dienen können. Ihre reversible Oxygenierbarkeit in organischen Lösungsmitteln soll geprüft werden. Schließlich soll untersucht werden, welche Modifizierung der Modellsubstanzen vorgenommen werden muß, um eine Oxygenierung unter physiologischen Bedingungen zu erreichen.

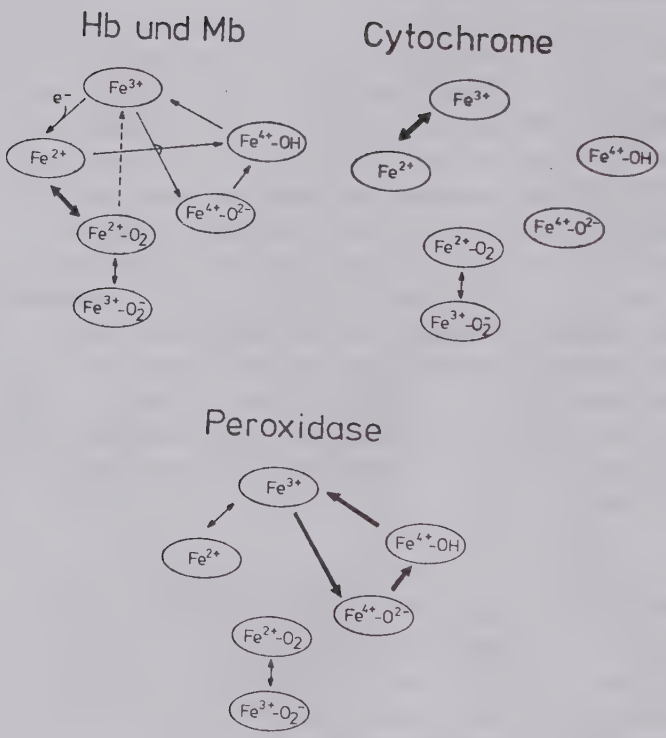



Abbildung 1: Reaktionscyclen bei Hämproteinen

Modellsubstanzen für Hb und Mg müssen im wesentlichen drei Anforderungen genügen:

1) Die sterischen Verhältnisse sollen der apolaren Tasche am Hb oder Mb angepaßt werden.

2) Die elektronische Umgebung muß so gewählt werden, daß das Redoxpotential des Eisens dem der natürlichen Vorbilder entspricht.

3) Das Modell muß solubilisiert werden, um unter physiologischen Bedingungen wirksam zu sein.

Ausgehend vom "picket-fence"-Porphyrin (15), einem Derivat des Tetraphenylporphyrins, sollen diese Anforderungen erfüllt werden. Bei der Synthese dieses Eisenporphyrins mit sterischer Hinderung spielt die Atropisomerie eine wichtige Rolle. Deshalb sollen als Grundlage für weitere Synthesen an orthosubstituierten Tetraphenylporphyrinderivaten Atropisomerentrennungen durchgeführt werden.

Diese Trennungen bereiten auf normalen LC-Säulen größte Schwierigkeiten (50). Es muß also versucht werden, eine Chromatographieanlage zu erstellen, die im präparativen Maßstab mit hoher Trennleistung arbeitet (prep. LC).

Gelingen solche Trennungen, kann man die Rotationsbarriere für die ortho-R-Phenyl-Rotation an meso-Tetraphenylporphyrinen über die $^{1}$H-NMR Spektroskopie bestimmen (50). Damit wird es möglich, sowohl "picket-fence"-Porphyrin als auch "tailed picket-fence"-Porphyrine (85) zu synthetisieren.

Für das Oxygenierungsverhalten von Eisenporphyrinen ist die Wahl des Liganden, der dem Eisenporphyrin zur Verfügung gestellt wird, von entscheidender Bedeutung. Deshalb soll in organischer Lösung der Einfluß verschiedener Imidazol-Liganden auf das Oxygenierungsverhalten von "picket-fence"-Porphyrinen untersucht werden. Ob eine Koordination der Imidazolliganden erfolgen kann, wird sowohl von der Konzentration des Liganden, als auch vom Lösungsmittel abhängen. Um solche Untersuchungen auch in wässriger Lösung durchführen zu können, muß eine Solubilisierung des "picket-fence"-Porphyrins erreicht werden.

Ein theoretisch besseres Modell als das "picket-fence"-Porphyrin stellt das "tailed picket-fence"-Porphyrin dar,

da hier der Ligand nicht extern zugegeben werden muß, sondern kovalent an das Porphyrinsystem gebunden werden kann. Verwendet man als Ligand z.B. Histidin, erreicht man zudem, daß eine weitere Kupplung an ein wasserlösliches Polymer möglich wird.
Deshalb soll ein Weg zur Synthese eines "tailed picket-fence"-Porphyrins mit Histidin als fünftem Liganden gesucht werden. Auch soll geprüft werden, ob eine Solubilisierung durch kovalente Bindung an ein wasserlösliches Polymer oder Protein möglich ist.

Schließlich soll bei den so gewonnenen Modellsubstanzen für Hb und Mb das Verhalten gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid in wässrigem Medium geprüft werden.
Dabei soll speziell der Einfluß des Polymers oder Proteins auf das Oxygenierungsverhalten untersucht werden.

## B. ALLGEMEINER TEIL

### 1. Hämoglobin

Die Eigenschaften von Hb werden von vielen Faktoren beeinflußt, deren Zusammenspiel den Sauerstofftransport im Blut ermöglicht.
Beim Sauerstofftransport wird pro Eisenatom ein Molekül Sauerstoff unter Bildung von Oxyhämoglobin angelagert. Das Verhältnis von Hb-$O_2$ zu Hb ist vom Sauerstoffpartialdruck abhängig, d.h. in sauerstoffarmem Gewebe wird Sauerstoff abgegeben, während in der Lunge Luftsauerstoff aufgenommen wird.
Hämoglobin ist ein Aggregat aus vier Proteinketten - dem Globin - und dem Häm - einem Eisen-Porphyrinkomplex.
Das Häm wirkt als prosthetische Grupe (Abbildung 2) und lagert den Sauerstoff an.

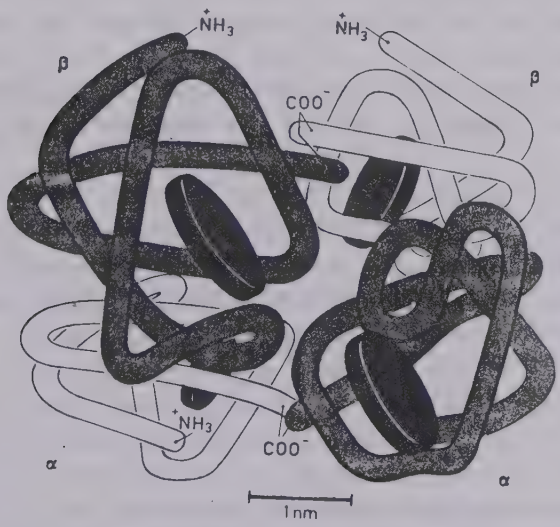



Abbildung 2: Hämoglobin

Hb hat ein Molekulargewicht von 68000 und enthält vier Eisenatome, d.h. vier Häme (Protoporphyrin IX), die sich in Taschen isoliert voneinander an der Oberfläche der Globinketten befinden (3,4).

1.1. Globin

Bei der Aufnahme von Sauerstoff treten starke Veränderungen in der Tertiär- und Quartärstuktur des Proteins auf (Allosterie), so daß die Sauerstoffsättigung am Hb nicht wie beim Mb, dessen Molekül nur aus einer Peptidkette und einem Häm besteht, hyperbolisch zur Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks steigt, sondern eine S-förmige Sättigungskurve aufweist (5,6).

Durch die Oxygenierung einer Kette wird die Konformation des Gesamtmoleküls so geändert, daß die folgenden drei Sauerstoffmoleküle fester gebunden werden.

Der Begriff der Allosterie wird allerdings heute weiter gefaßt: Während man früher allosterische Effekte bei monomeren Proteinen ausschloß, kennt man heute auch bei diesen Proteinen Veränderungen der Tertiärstruktur durch kleine Moleküle, die einen Einfluß auf das aktive Zentrum haben können (7).

2,3-Bisphosphoglycerat (DPG) wird als ein solches Molekül angesehen (Abbildung 3). Ist seine Wirkungsweise auch nur zum Teil bekannt, vermutet man doch seit langem (8), daß es einen Stoff geben muß, der die $O_2$-Affinität von Hb reguliert.

Erst seit 1967 wird die Funktion von DPG untersucht (9,11, 12). DPG - ein Zwischenprodukt der Glykolyse (14) - liegt in Erythrocyten in relativ hoher Konzentration vor (4-5 mMol/l) und wird vom tetrameren Desoxyhämoglobin gebunden. Dabei wird es in die zentrale Höhlung des Hb eingelagert und beeinflußt von dort aus alle vier Ketten, indem die

Phosphatgruppen mit positiv geladenen Gruppen von Lysin und Histidin in Wechselwirkung treten. Dadurch wird die Raumstruktur so verändert, daß die Sauerstoffaffinität sinkt. Dieser Mechanismus wurde durch Röntgenstrukturuntersuchungen gestützt (10).

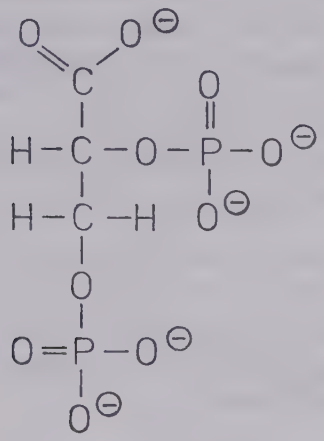


Abbildung 3: 2,3 Bisphosphoglycerat (DPG), ein allosterischer Effektor

Unberücksichtigtblieb bisher die Tatsache, daß ein Überschuß von DPG im Blut die Sauerstoffaffinität von Hb weiter senkt (11). Es muß deshalb für die Wirkungsweise des DPG noch einen weitergehenden und bisher ungeklärten Mechanismus geben, aufgrund dessen die $O_2$-Affinität von z.B. Myoglobin oder von Modellsubstanzen gesteuert werden könnte. DPG könnte also auch bei Modellsubstanzen als allosterischer Effektor wirken.

Neben seiner Funktion als Sauerstoffträger hat Hb auch die Aufgabe $CO_2$ abzutransportieren, das bei der Oxidation der Nährstoffe in der Muskulatur zusammen mit Milchsäure entsteht.

Auch dieser Vorgang beeinflußt den sigmatropen Verlauf der Sauerstoffsättigungskurve des Hb aufgrund seiner pH-Abhängigkeit (Bohr-Effekt).

Da Protonen die Affinität des Hb gegenüber Sauerstoff herabsetzen, muß umgekehrt Sauerstoff die Affinität zu Protonen erniedrigen. Daher kann das Hämoglobin nach Freisetzung von Sauerstoff Protonen binden, die bei der Reaktion

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow HCO_3^- + H^+$$

entstehen. Dies geschieht im wesentlichen an Histidinresten in den β-Globinketten.

Kohlendioxid wird nicht an Häm komplexiert, sondern zum Teil in Form eines Carbamats an den α-Aminogruppen am Ende der vier Polypeptidketten gebunden. Bei der Beladung mit Sauerstoff zerfallen diese Carbamatgruppen wieder in $CO_2$ und die freien Aminogruppen (13).

Bei der Entwicklung wasserlöslicher Modellsubstanzen für Hämoglobin muß langfristig dieser pH-Abhängigkeit des Sauerstoff- bzw. $CO_2$-Transports ebenso Beachtung geschenkt werden, wie der Allosterie. Es ist deshalb zu erwarten, daß Modelle, die in organischen Lösungsmitteln oxygenierbar sind, in wässriger Lösung ganz andere Eigenschaften als Hb zeigen, wenn man sie lediglich an wasserlösliche Polymere bindet. Es müssen daher die kooperativen Effekte des Globins bzw. seine Eigenschaften als Proteine ganz allgemein berücksichtigt werden. Als wasserlöslicher Träger für Modellsubstanzen würde sich z.B. Serumalbumin anbieten.

### 1.2. Hämin

Die Funktion des Häms ist weit besser geklärt und leichter zu überschauen. Seine hervorstechendste Eigenschaft besteht darin, daß im Protoporphyrin IX das Eisen während des gesamten Sauerstofftransports in der zweiwertigen Oxidations-

stufe vorliegt. Das Oxidationspotential des Eisen(II)-ions wird so gesteuert, daß die Oxidation von $Fe^{2+}$ zu $Fe^{3+}$ durch molekularen Sauerstoff zugunsten einer reversiblen Oxygenierung zurückgedrängt wird. Dies geschieht durch elektronische Effekte ebenso wie durch Ligandeneinflüsse.

Häm liegt im Hb eingebettet in einer apolaren, hydrophoben Tasche, die Wasser bzw. acide Protonen vom Aktivzentrum fernhält. Das Eisen im Protoporphyrin IX wird vom proximalen Imidazol eines entsprechenden Histidylrestes komplexiert (Abbildung 4), während das distale Histidin offenbar keine oder nur eine lockere Wechselwirkung mit dem Aktivzentrum eingeht.

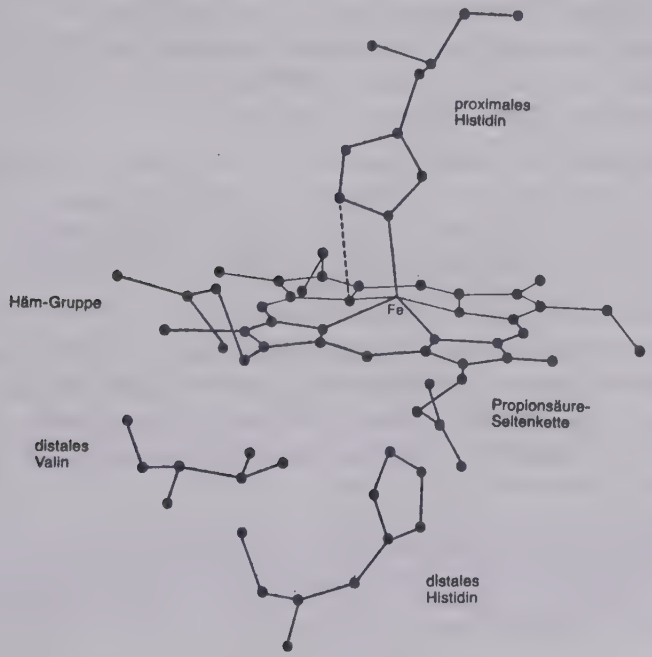



Abbildung 4: Die Hämgruppe und einige sie umgebende Aminosäuren.

## 2. Modellsubstanzen für Hämoglobin und Myoglobin

Das Ziel, eine dem Hämin ebenbürtige Modellsubstanz zu synthetisieren, ist bis heute nicht erreicht. Schon die Herstellung eines stabilen Fe(II)-Sauerstoffkomplexes bereitet Schwierigkeiten.

Aus Arbeiten verschiedener Autoren (15-31) lassen sich aber die Voraussetzungen ableiten, die die Oxygenierung eines Hämmodells ermöglichen (32,33).

1) Das Oxidationspotential des Eisenporphyrins muß ausreichend groß sein, um einen lockeren π-Komplex zwischen Sauerstoff und Eisen(II) zu erhalten. Das $Fe^{2+}$-Ion sollte eine high-spin $d^6$ Elektronenkonfiguration in einer quardratisch-pyramidalen fünffachen Koordination besitzen. Die sechste Koordinationsstelle sollte frei oder nur von einem schwachen Liganden besetzt sein.

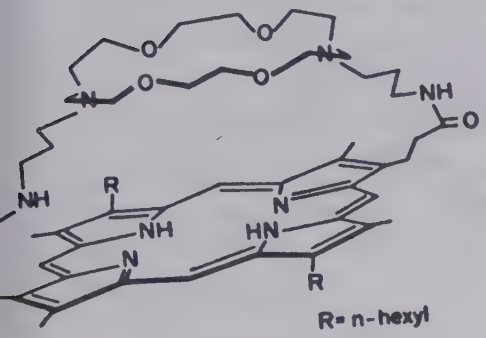
2) Acide Protonen oder Wasser müssen von der Koordinationsstelle des Sauerstoffs ferngehalten werden. Dies geschieht durch eine hydrophobe Umgebung oder basisches Medium, wobei allerdings die Base koordiniert wird.

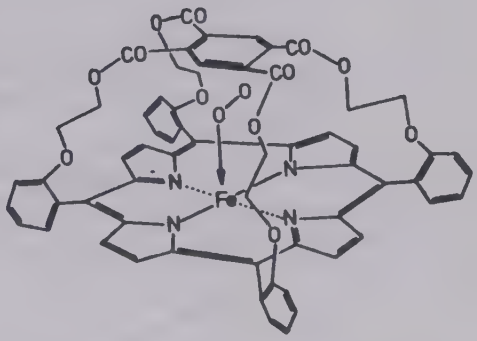
3) Eine Dimerisierung muß verhindert werden. Dies läßt sich durch eine sterische Hinderung bewirken, die die Bildung des dimeren μ-oxo-Fe(II)-Komplexes als Endprodukt der Reaktion mit Sauerstoff ausschließt. Auch das Arbeiten bei tiefen Temperaturen oder in hoher Verdünnung verzögert den Dimerisierungsprozess.

Bei Berücksichtigung dieser Faktoren ist die Synthese eines Mb-Modells möglich. Kooperative Eigenschaften des Hb werden dabei außer Acht gelassen.

Die Verhinderung der Dimerisierung wurde nach zwei Konzepten bei tiefen Temperaturen erreicht. So lassen sich Eisenporphyrine, die in einer Polystyrolmatrix immobilisiert sind (22,23) oder in fester Form (34-36) oxygenieren.

Die zweite Möglichkeit besteht in der Einführung sterisch hindernder Gruppen, die die Ausbildung des μ-oxo-Fe M-Komplexes unterdrücken (49). Baldwin (37) und Chang (18) entwarfen die "capped" bzw. "crowned" Porphyrine (Abbildung 5).




a) b)

Abbildung 5: a) "crowned" Porphyrin nach Chang (18)
b) "capped" Porphyrin nach Baldwin (37)

Diese im Prinzip ähnlichen Modelle haben offenbar den Nachteil, daß sie den Angriff des Sauerstoffs als "end-on"-Liganden am Eisen nicht ausreichend begünstigen; auch wird der Sauerstoffkomplex zu wenig durch basische Gruppen stabilisiert.

Das bisher leistungsfähigste Modell stellten Collman et al. vor (51). Im "picket-fence"- oder Lattenzaunporphyrin wird die apolare Tasche, in die beim Mb und Hb das Häm eingelagert ist, am wirkungsvollsten imitiert (Abbildung 6).

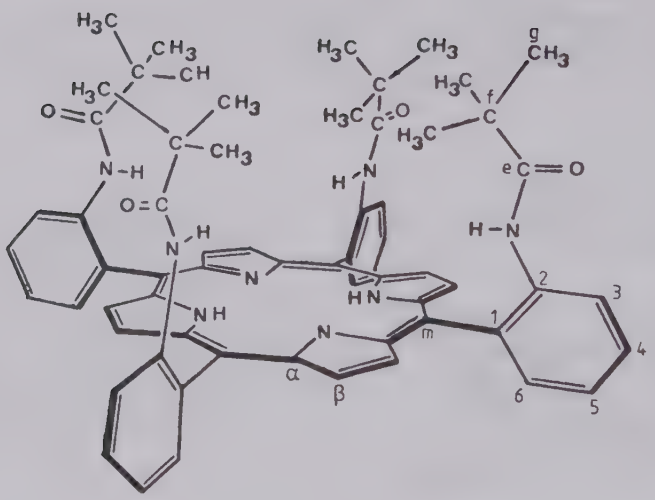


Abbildung 6: Das "picket-fence"-Porphyrin

Bemerkenswert an diesem Fe(II)-Komplex des meso-Tetra(αααα-orthopivaloylamidophenyl)porphyrins ist, daß sowohl durch sterische wie auch durch elektronische Effekte der Sauerstoffkomplex stabilisiert wird. Der Sauerstoff kann nur als "end-on"-Ligand am Eisen angreifen und ist durch die Tertiärbutylgruppen vor einer Weiterreaktion geschützt.

Die Nachteile dieses Modells bestehen darin, daß es wasserunlöslich ist und der Ligand extern zugegeben werden muß. Auch ist der Sauerstoffkomplex zu instabil, um als Myoglobinanalogon gelten zu können.

Um diese oder ähnliche Modelle zu verbessern und dem natürlichen Vorbild anzupassen, wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen:

1) Das Redoxpotential des Eisens wird wesentlich durch den fünften Liganden beeinflußt. Seine Variation und Koordination wird untersucht (16,27,38,39).

2) Durch kovalente Bindung der Base am Porphyrinsystem wird eine sechsfache Koordination in organischer Lösung weitgehend verhindert und die Dimerisierung wird zusätzlich erschwert.

3) Das niedermolekulare Porphyrinsystem wird kovalent (38-42) oder koordinativ (36, 43-46) an ein wasserlösliches Polymer gebunden. Durch den Einschluß des Porphyrins in das Polymerknäuel soll eine Immobilisierung erzielt und die Aggregatbildung von Porphyrinsystemen (47) vermieden werden.

Ausgehend von diesen Überlegungen müßte ein Hämmodell auf der Basis des "picket-fence"-Porphyrins erfolgversprechend sein, das intern einen Imidazolliganden besitzt und polymergebunden ist.

## 3. Das "picket fence"-Porphyrin

Das Konzept des "picket-fence"-oder Lattenzaunporphyrins ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

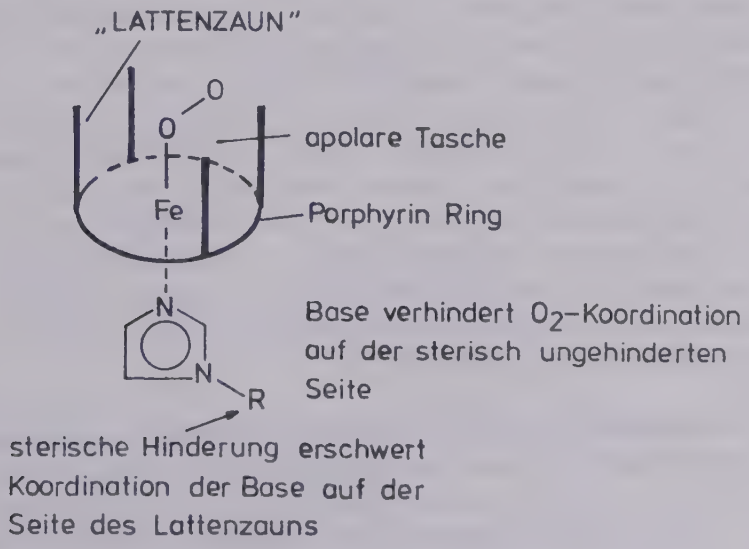



Abbildung 7: Das Konzept des "Picket-fence"-Porphyrins

### 3.1. Synthese und Atropisomerie

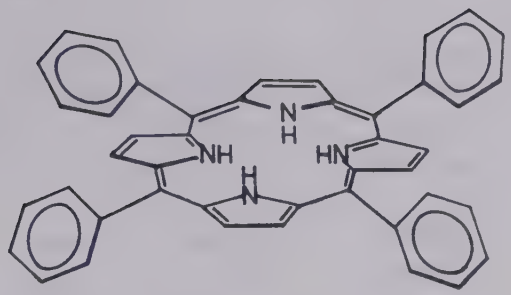
Für die Synthese des "picket-fence"-Porphyrins ist die Trennung von Atropisomeren an orthosubstituierten meso-Tetraphenylporphyrinen entscheidend.

Ullmann (48) stellte eine solche Isomeren-Trennung vom Biphenyltyp erstmals am Beispiel des meso-Tetra(ortho-hydroxyphenyl)porphyrins $H_2T\ PP(OH)_4$ vor. Bei diesen TPP-Derivaten steht die Phenylgruppe praktisch senkrecht zur Porphyrinebene, wobei die ortho-ständigen Substituenten oberhalb (α-Position) oder unterhalb (β-Position) der Porphyrinebene angeordnet sind (Abbildung 8).

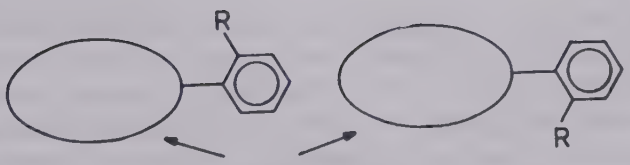
Die vier möglichen Atropisomere können durch Äquilibrierung ineinander überführt werden und liegen dann im statistischen Verhältnis vor (Abbildung 9). Wie leicht ein Isomer in die Atropisomerenmischung überführt werden kann, hängt von der sterischen Hinderung durch die orthoständigen Substituenten bzw. der Temperatur ab (15).

Die Energiebarriere beim $H_2T\ PP(OH)_4$ ($t_{1/2}$=30 Min., T=25°C) erlaubt eine Trennung der Atropisomere mittels DC. Die Einführung sterisch stark hindernder Gruppen - wie es das Konzept des "picket-fence"-Porphyrins verlangt - bereitet beim αααα $H_2T\ PP(OH)_4$ Schwierigkeiten, da die Phenolgruppen wegen ihrer geschützten Lage zu wenig reaktiv sind. So sind für die Ausbildung von Ethern oder Estern Temperaturen nötig, die leicht zu einer Reisomerisierung des αααα $H_2T\ PP(OH)_4$ führen (49). Eine Isomerentrennung nach der Reaktion ist wegen der geringen Polaritätsunterschiede der einzelnen Atropisomere nicht möglich.

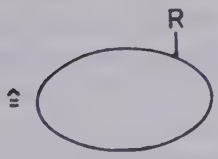
Collman beschritt deshalb den Weg über eine Aminogruppe als orthoständigem Substituenten am TPP (50,51). Durch oxidative Kondensation von ortho-Nitrobenzaldehyd und Pyrrol gelangt man in relativ guten Ausbeuten (15 %) zum meso-Tetra(ortho-nitrophenyl)porphyrin $H_2\ TPP(NO_2)_4$.




TPP unsubstituiert




R in α-Position




R in β-Position

Abbildung 8: α- und β-Position bei orthosubstituierten Tetraphenylporphyrinen

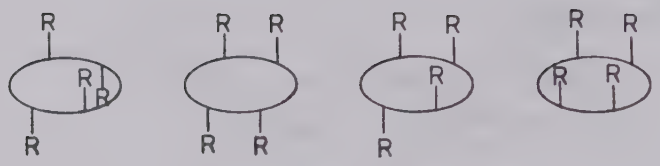

R
R
R

Tabelle 1: Trennung der Atropisomere von $H_2TPP(NH_2)_4$ durch prep. LC

| Atropisomere von $H_2TPP(NH_2)_4$ | Retentionszeit (Säulenchromatographie) Min | $R_F$ (DC) | % statistisch berechnet | % Ausbeute gefunden |
|---|---|---|---|---|
| αβαβ | 21.1 | 0.57 | 12.5 | 15 |
| ααββ | 28.0 | 0.40 | 25 | 23 |
| αααβ | 49.1 | 0.19 | 50 | 48 |

stationäre Phase: 220 g TLC Kieselgel 60 H 15 um
Probe: 1 g $H_2TPP(NH_2)_4$ in 15 ml $CHCl_3/(C_2H_5)_2O$ 3:1
Eluens: $CHCl_3$/Ether 3:1
Detektor: UV, $\lambda$ = 550 nm
Flußrate: 25 ml/min
Temperatur: 12°C

Dazu werden sie 3h unter Stickstoff in $CHCl_3$ am Rückfluß gekocht. Durch Wiederholen dieses Kreislaufes lassen sich etwa 70 % der Atropisomerenmischung in αααα$H_2TPP(NH_2)_4$ überführen. Die Rotationsbarriere für die orthoständige Aminogruppe liegt bei 25°C.

Läßt man das αααα$H_2TPP(NH_2)_4$ mit einem Überschuß an Acetylchlorid zum αααα-meso-Tetra(acetylamidophenyl)porphyrin αααα$TPPAc_4$ reagieren und erwärmt dieses Isomer langsam, so tritt bei ca. 90°C vollständige Reisomerisierung ein. Durch DC und prep. LC läßt sich das Atropisomerengemisch der Acetylverbindung trennen.
Die Daten für die Trennung von $H_2TPPAc_4$ gibt Tabelle 2 wieder (vergl. B.3.2. u. 5.).
Nach der entsprechenden Reaktion mit Isobuttersäurechlorid war eine solche Trennung nicht mehr möglich, sodaß die Rotationsbarriere nur noch mittels $^1$H-NMR Spektroskopie ermittelt werden kann (52).

Tabelle 2:

| Atropisomere von $H_2TPPAc_4$ | Retentionszeit (Säulenchromatographie) Min | $R_F$ (DC) | % statistisch berechnet | % Ausbeute gefunden |
|---|---|---|---|---|
| αβαβ | 26 | 0.59 | 12.5 | 14 |
| ααββ | 31 | 0.48 | 25 | 26 |
| αααβ | 35 | 0.34 | 50 | ca. 55 |
| αααα | 36 | 0.29 | 12.5 | ca. 10 |

stationäre Phase: 230 g TLC Kieselgel 60 H 15 um
Probe: 0.5 g $H_2TPPAc_4$ in 10ml Dioxan/$CCl_4$ 2:1
Eluens: Dioxan/$CCl_4$ 2:1
Detektor: UV, $\lambda$ = 579 nm
Flußrate: 20 ml/min
Temperatur: 25°C

Auch die Isomere der pivaloylsubstituierten Verbindung - dem eigentlichen "picket-fence"-Porphyrin - lassen sich nur noch mittels $^1$H-NMR Spektroskopie unterscheiden. Erst bei 130°C läßt sich für αααα $H_2TPP\ PIV_4$ eine merkliche Reisomerisierung nachweisen.

Die Darstellung des Eisenkomplexes von αααα$TPP\ PIV_4$ nach den üblichen Methoden (64) bereitet Schwierigkeiten, weil ein Einbau des Eisens aufgrund der sterischen Hinderung am "picket -fence"-Porphyrin nur von einer Seite her möglich ist. Verwendet man Fe(II)-Acetat oder $FeCl_2$ in DMF, THF oder HOAc führt dies nicht zum Eisenkomplex. Nur mit wasserfreiem $FeBr_2$ in THF und anschließender Reinigung über basischem $Al_2O_3$ mit Chloroform als Eluens ist die Synthese des Fe(αααα$TPP\ PIV_4$)Br möglich. Der gelungene Eiseneinbau zeigt sich auch im $^1$H-NMR Spektrum (Abbildung 10).

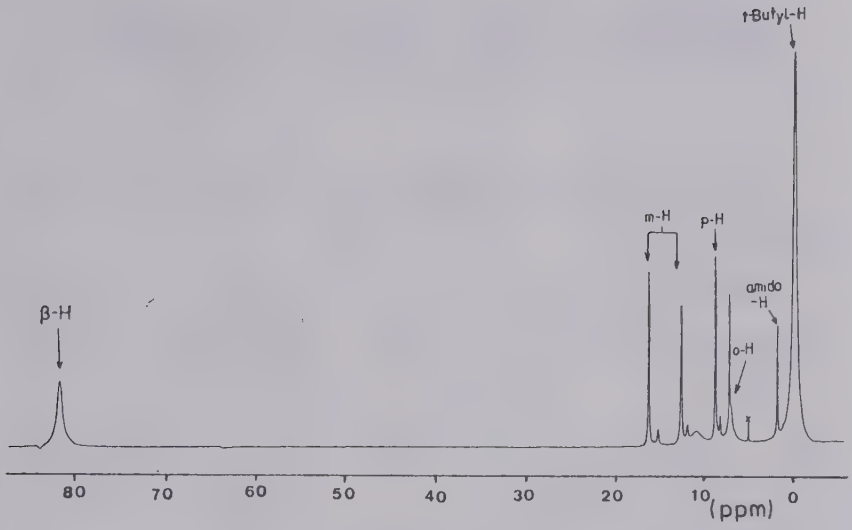



Abbildung 10: $^{1}$H-NMR Spektrum von Fe(III) (αααα TPP PIV$_4$)Br in $CDCl_3$

Man erkennt deutlich die Verschiebung der β-Pyrrolprotonen nach extrem tiefem Feld. Das Syntheseschema für das "picket-fence"-Porphyrin ist in Abbildung 11 zusammengefaßt.

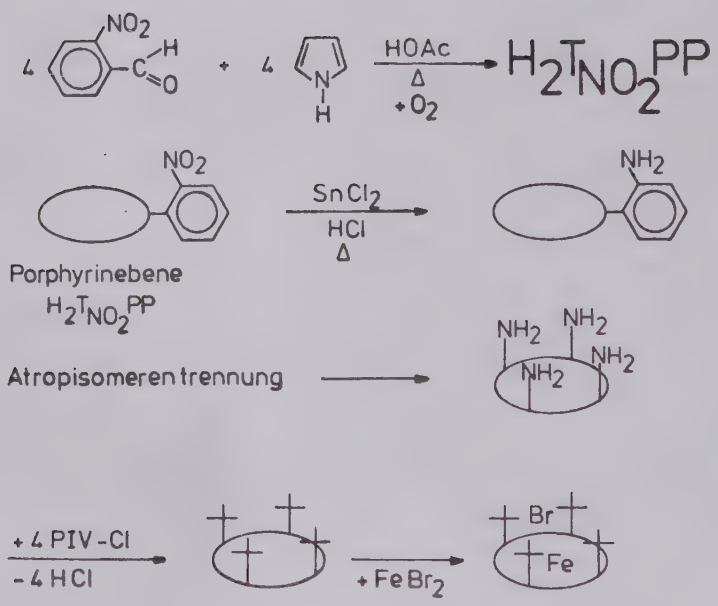



Abbildung 11: Syntheseschema für das "picket-fence"-Porphyrin
† ≙ NH-CO-C(CH$_3$)$_3$

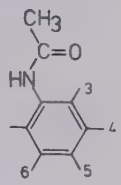
## 3.2. $^1$H-NMR Untersuchungen von orthosubstituierten TPP-Derivaten

Für Strukturuntersuchungen bei Atropisomeren von TPP-Derivaten ist die $^1$H-NMR-Spektroskopie neben der Röntgenstrukturanalyse die einzige in Frage kommende Methode.
Aufgrund der magnetischen Anisotropie der Porphyrine läßt sich recht genau die Lage der Substituenten zum Porphyrinsystem bestimmen. Die Lage von Substituenten in magnetisch äquivalenter Position läßt sich aufgrund der unterschiedlichen gegenseitigen Abschirmung feststellen.

So können die einzelnen Atropisomere des $H_2TPP\ PIV_4$ sehr genau am Signal der tert.-Butylgruppen unterschieden werden (50). Die $^1$H-NMR-Daten für die Atropisomere von $H_2TPPAc_4$ gibt Tabelle 3 wieder. Die Zuordnung im Aromatenbereich wurde durch entsprechende Entkopplungsexperimente gesichert (Abbildung 12).

Tabelle 3: $^1$H-NMR-Daten der 4 Atropisomere von $H_2TPPAc_4$

| Proton | αβαβ | ααββ | αααβ | αααα |
|---|---|---|---|---|
| innere H (2H) | - 2.75 | - 2.75 | - 2.74 | - 2.77 |
| Acetyl H (12H) | 1.43 | 1.35 | 1.46<br>1.37<br>1.32 | 1.51 |
| Amid H (4H) | 6.70 | 6.73 | 6.77 | 6.74 |
| Phenyl H (16H) | | | | |
| H-5 | 7.52 | 7.52 | 7.50 | 7.51 |
| H-4 | 7.85 | 7.85 | 7.83 | 7.81 |
| H-6 | 8.07 | 7.95 | 7.93 | 7.91 |
| H-3 | 8.65 | 8.68 | 8.65 | 8.67 |
| β-H (8H) | 8.85 | 8.85 | 8.83 | 8.82 |




Die ungewöhnlich starke Verschiebung der Signale für die Protonen in meta-Stellung am Phenylring erklärt sich dadurch, daß eine Wasserstoffbrückenbindung zur CO-Gruppierung des ortho-Substituenten besteht.
Das bedeutet, daß das Proton des Amids zum Zentrum des Komplexes zeigt, während die CO-Gruppe nach außen weist. Dies scheint von entscheidender Bedeutung für die Erklärung des Oxygenierungsverhaltens von "picket-fence"-Poprhyrinen zu sein (vgl. 3.5.2.).

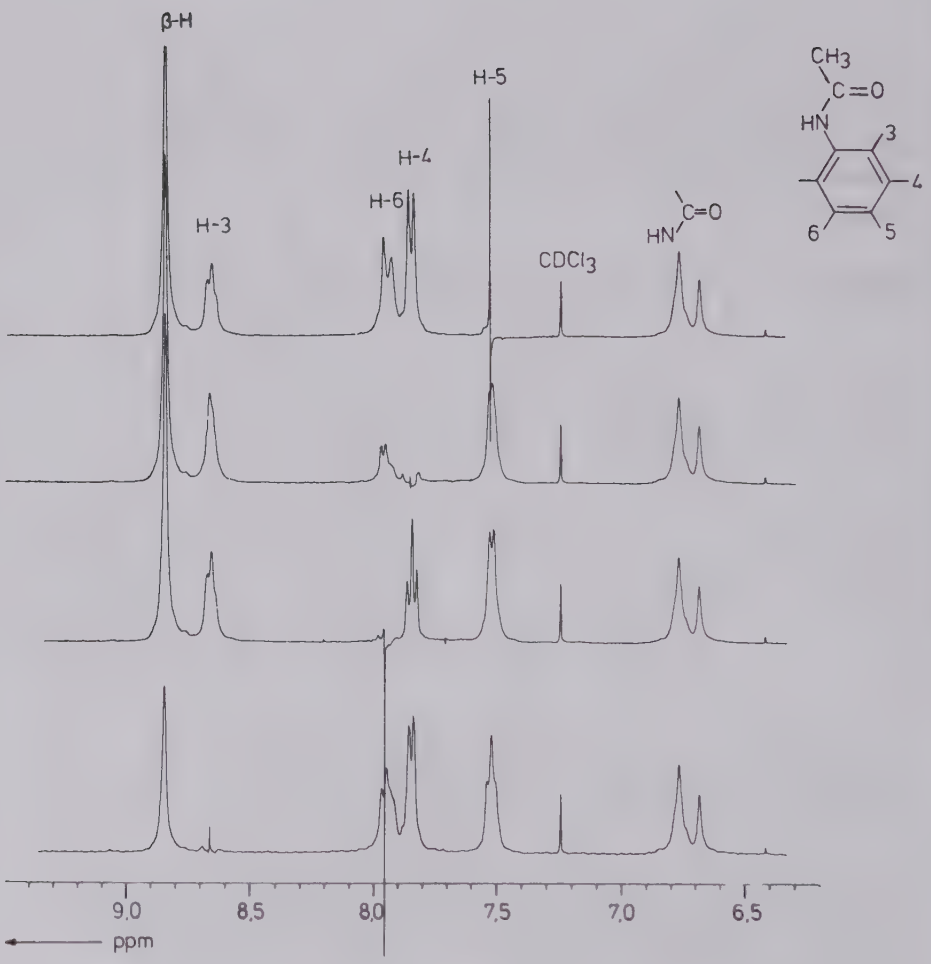



Abbildung 12: Zuordnung der Resonanzen für die Phenylprotonen bei αααα$H_2$TPPAc$_4$ durch Entkopplungsexperimente.

Das $^1$H-NMR-Spektrum von αααα$H_2$TPPAc$_4$ zeigt Abbildung 13. Die auftretende Änderung der Signale im Bereich der Methylprotonen beim Erhitzen der Probe ist in Abbildung 14 wiedergegeben.

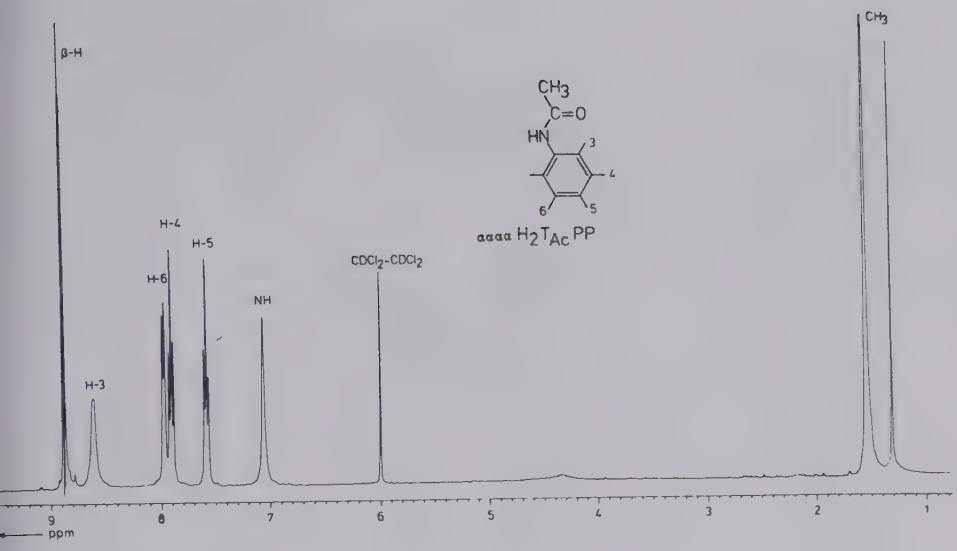



Abbildung 13: $^1$H-NMR-Spektrum von $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPPAc_4$

Die Zuordnung der dabei neu auftretenden Signale erfolgte durch Vergleich mit den Werten der einzelnen Atropisomere (Tabelle 3). Man erkennt sehr deutlich, daß sich erst das $\alpha\alpha\alpha\beta H_2TPPAc_4$ bildet, und anschließend die beiden anderen Atropisomere entstehen. Nach ca. 5h Erhitzen bei 90°C hat sich das statistische Gleichgewicht der Atropisomere eingestellt (c = 0.19 mol/l).

Berechnet man aus den Methylsignalen der Acetylgruppen die Konzentrationsänderungen der einzelnen Isomere in Abhängigkeit von der Zeit (bezogen auf n-Heptan als Standard), lassen sich aus der Steigerung der Kurven (Abbildung 15) die Konstanten für die Reaktionsgeschwindigkeit bei 90° C abschätzen: (s.S. 26)

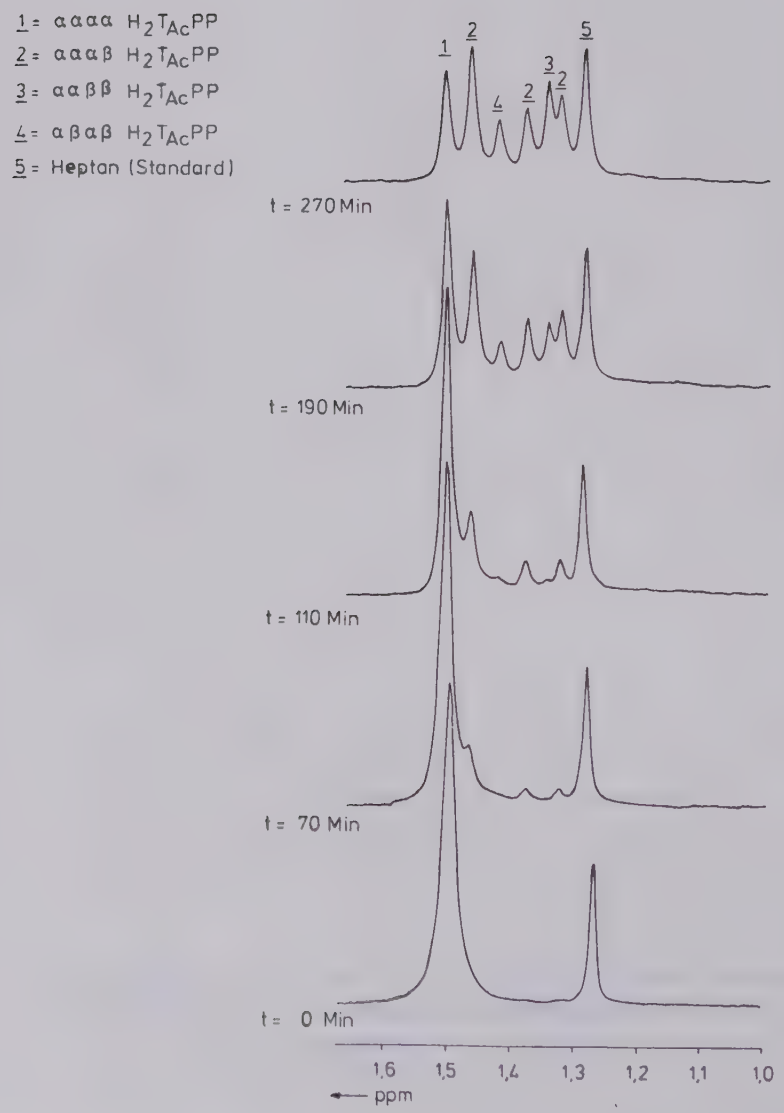



Abbildung 14: Änderung der $^1$H-NMR Signale im Bereich der Methylprotonen bei der Reisomerisierung von αααα$H_2$TPPAc$_4$

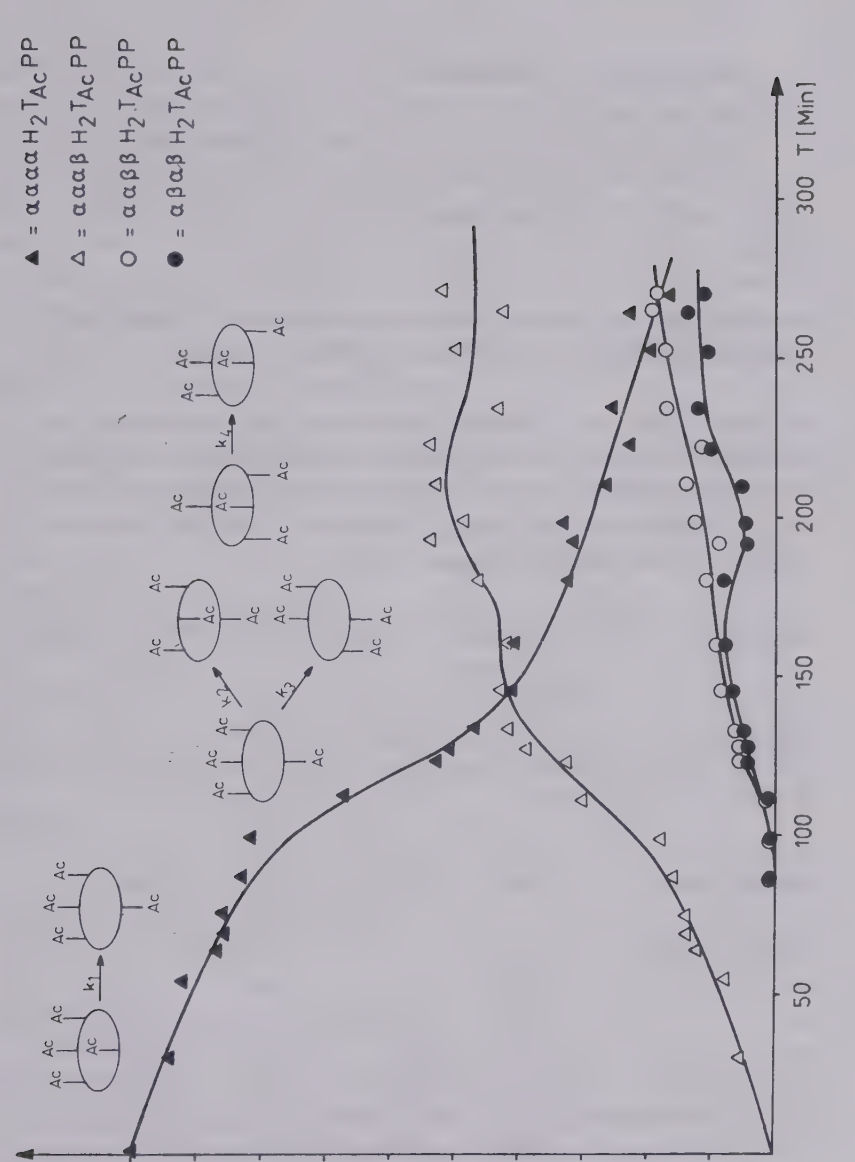



Abbildung 15: Konzentrationsänderung der Atropisomere beim Erhitzen von αααα$H_2$TPPAc$_4$

$k_1 = 9.9 \cdot 10^{-7}$ Mol/Min

$k_2 = 1.3 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min

$k_3 = 8.2 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min

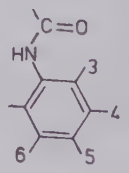
$k_4 = 1.7 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min

Für $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPPAc_4$ ergibt sich aus Abbildung 15 eine Halbwertszeit von $t_{1/2}$ = 130 Min bei 90°C.

Vergleicht man die $^1$H-NMR-Signale der Acetylderivate mit denen der pivaloylsubstituierten Verbindungen (50) zeigt sich (Tabelle 4), daß die sperrigen Pivaloylgruppen weit mehr zur Spannung des Porphyrinringes beitragen als die entsprechenden Acetylgruppen.

Tabelle 4: δ-Werte [ppm] der 4 Atropisomere von $H_2TPPPIV_4$

| Proton | αβαβ | ααββ | ααaβ | αααα |
|---|---|---|---|---|
| innere H (2H) | - 2.52 | - 2.54 | - 2.56 | - 2.52 |
| Pivaloyl H (36H) | 0.24 | 0.15 | 0.22<br>0.16<br>0.11 | 0.07 |
| Amid H (4H) | 7.20 | 7.20 | 7.32<br>7.20 | 7.20 |
| Phenyl H (16H) | | | | |
| H-5 | 7.51 | 7.54 | 7.49 | 7.48 |
| H-4 | 7.80 | 7.83 | 7.82 | 7.80 |
| H-6 | 7.91 | 7.93 | 7.92 | 7.90 |
| H-3 | 8.73 | 8.76 | 8.77 | 8.73 |
| β-H (8H) | 8.84 | 8.87 | 8.86 | 8.82 |



Dies wird besonders an der Verschiebung der NH-Protonen deutlich. Der gleiche Effekt macht sich bei der successiven Einführung von Pivaloylgruppen am $H_2TPP(NH_2)_4$ bemerkbar (Tabelle 5): Je mehr Pivaloylgruppen eingeführt werden, desto stärker wird das Porphyringerüst gespannt, was dazu führt, daß der Ringstrom abnimmt, und so die inneren Protonen deutlich weniger hochfeldverschoben sind. Der umgekehrte Effekt tritt bei den β-Pyrrolprotonen auf, wenngleich hier der Effekt aufgrund des Einflusses des separaten Phenylringstroms weniger ausgeprägt ist.

Tabelle 5: δ-Werte [ppm] von mono-, di-, tri- und tetrapivaloylsubstituiertem αααα$H_2TPP(NH_2)_4$

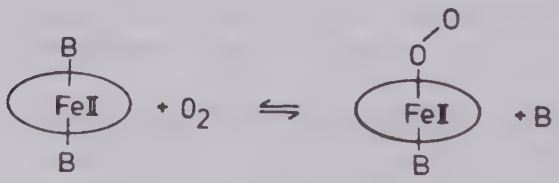
| Porphyrin αααα - | β-Pyrrol H | innere NH |
|---|---|---|
| $H_2TPP(NH_2)_4$ | 8.89 (8 H) | - 2.86 |
| $H_2TPP(NH_2)_3$ PIV | 8.89 (6 H)<br>8.82 (2 H) | - 2.65 |
| $H_2TPP(NH_2)_2$ $PIV_2$ | 8.90 (4 H)<br>8.80 (4 H) | - 2.56 |
| $H_2TPP(NH_2)$ $PIV_3$ | 8.93 (2 H)<br>8.82 (6 H) | - 2.59 |
| $H_2TPP$ $PIV_4$ | 8.82 (8 H) | - 2.52 |

### 3.3. Reaktionen mit Sauerstoff

Bei der Reaktion von Eisen(II)-Porphyrinen mit Sauerstoff wird den Bedingungen, die zu einer reversiblen Anlagerung des Sauerstoffs am Eisen(II)-Komplex führen, besonderes Interesse geschenkt. Im Gegensatz zu anderen π-Akzeptoren - wie z.B. CO - besitzt das Sauerstoffmolekül ausgeprägte oxidierende Eigenschaften, die zu einer Reduktion des $O_2$-Moleküls und damit zu einer Oxidation des Metallatoms führen.

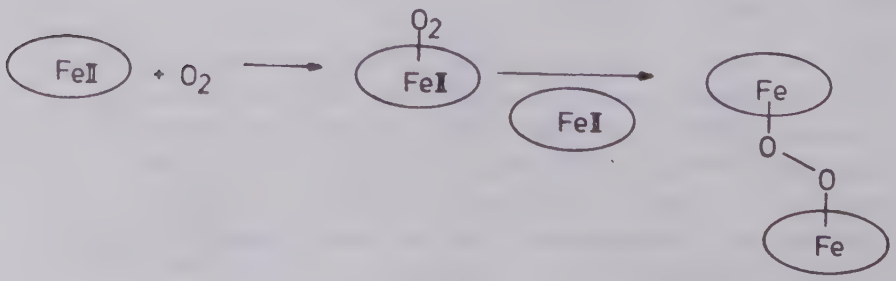
Eine Oxygenierung kann deshalb nur mit Metallen in niedrigen Oxidationsstufen erfolgen, da eine ausreichende Elektronendichte am Metall vorhanden sein muß, um mit dem Sauerstoff in Wechselwirkung zu treten. Dabei muß die Elektronendichte durch geeignete Liganden noch erhöht werden.

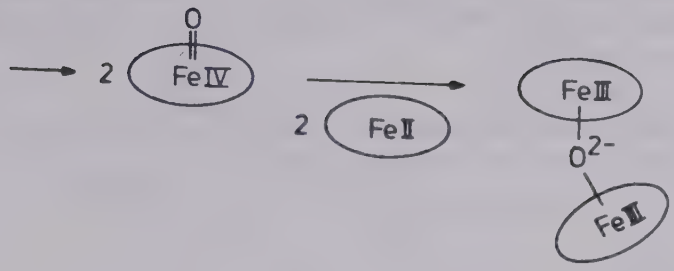
In synthetischen Porphyrinsystemen versteht man unter Oxygenierung einen Ligandenaustausch durch Sauerstoff, oder die Anlagerung von $O_2$ als sechsten Liganden an einen fünffach koordinierten Komplex.




Als Liganden werden cyclische Amine, Pyridin und Imidazolderivate eingesetzt.

In Abwesenheit einer axialen Base reagiert das Eisen(II)-Porphyrin mit Sauerstoff unter Bildung eines antiferromagnetischen μ-oxo-Dimeren als letztem Produkt.






Ein allgemein gültiger Oxidationsmechanismus über ein mehr oder weniger stabiles Oxygenierungsprodukt läßt sich jedoch nicht formulieren, da sich je nach Milieu auch die oxidierenden Eigenschaften des Sauerstoffs änderen (53).

In apolaren aprotischen Lösungsmitteln wird ein Oxidationsmechanismus diskutiert, bei dem der Sauerstoffkomplex über die mesomere Grenzformel

beschrieben wird (54, 55). Durch IR- und Röntgenstrukturuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Grenzform eines Hyperoxidanions am Eisen einen gewissen Anteil am Sauerstoffkomplex hat (64,65). Der $O_2^-$-Komplex reagiert mit einem weiteren fünffach koordinierten Eisen(II)-porphyrin zum μ-Peroxokomplex (56,57), der über einen Zerfall zum Fe(IV)-Komplex und Weiterreaktion mit überschüssiger Fe(II)-Spezies zum Endprodukt, dem μ-oxo-bis-Eisen(III)-porphyrin, reagiert. Mittels $^1$H-NMR-Spektroskopie konnten La Mar und Balch (60) beim "picket-fence"-Porphyrin in

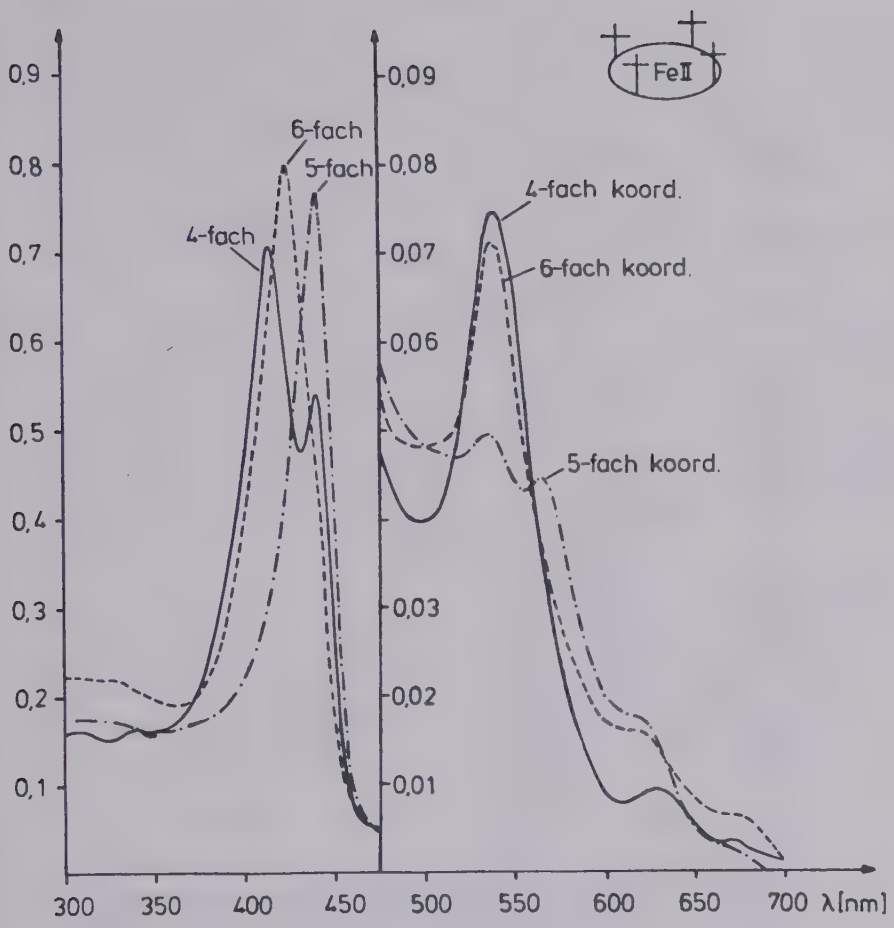
Toluol den Sauerstoffkomplex [TPP.PIV$_4$] FeO$_2$, den μ-Peroxokomplex [TPP.PIV$_4$]Fe$^{III}$O$_2$Fe$^{III}$[TPP.PIV$_4$] und das μ-oxo-Dimere [TPP.PIV$_4$]Fe$^{III}$OFe$^{III}$[TPP.PIV$_4$] bei tiefen Temperaturen nachweisen.

In protischen Lösungsmitteln wird die Oxidation des $Fe^{2+}$-Komplexes durch $H^+$-Ionen katalysiert.

Zwar sollen im "picket-fence"-Porphyrin die Tertiärbutylgruppen auch einen solchen Angriff verhindern, aber es läßt sich leicht zeigen, wie empfindlich dieses Modell gegenüber Wasser oder Protonen ist. Verwendet man destilliertes Toluol als Lösungsmittel, das man nicht über basisches $Al_2O_3$ geleitet hat, ist der Sauerstoffkomplex kaum nachzuweisen.

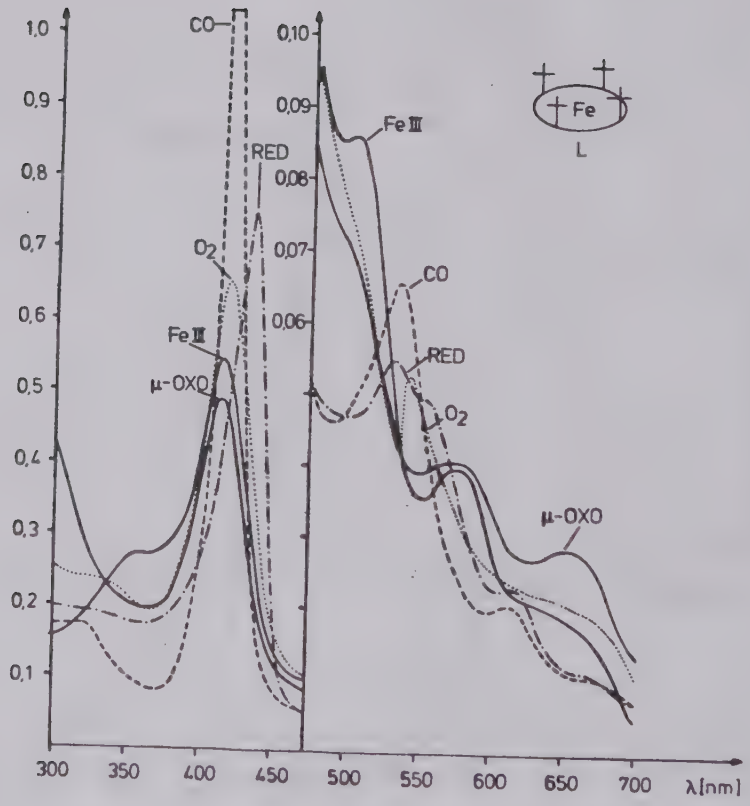
Die UV-Spektren des vierfach koordinierten (ohne Ligand), des fünffach koordinierten (2-Methylimidazol als Ligand) und des sechsfach koordinierten Eisen(II)-"picket-fence"-Porphyrins zeigt Abbildung 16.
Die unterschiedliche Koordination wird im Bereich der Soretbande besonders deutlich. Hier treten Verschiebungen von mehr als zehn Nanometer auf. Im Bereich der Q-Bande unterscheidet sich nur der fünffach koordinierte Komplex wesentlich von der vier- bzw. sechsfach koordinierten Spezies.

Das Oxygenierungsverhalten und das Spektrum des CO-Komplexes gehen aus Abbildung 17 hervor.




| | Ligand | Über-schuß | Koord. | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|---|---|---|
| FeII[TPP.PIV$_4$] | --- | --- | 4 | 417, 435 | 535 |
| | 2-Methyl-imidazol | 200 | 5 | 434 | 535, 559 |
| | N Methyl-imidazol | 2000 | 6 | 426 | 536 |

Abbildung 16: UV-Spektrum des "picket-fence"-Porphyrins in unterschiedlicher Koordination, gemessen in Toluol/$H_2O$ $C \approx 10^{-5}$ mol/l




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| FeIII (FeIII) | 422 | 502, 575 |
| Fe II (Red) | 431 | 538, 559, 605 |
| $O_2$ Komplex ($O_2$) | 428 | 545 |
| CO-Komplex (O) | 429 | 539, 615 |
| μ-oxo-Dimer (μ-oxo) | 421 | 580, 660 |

Abbildung 17: UV-Spektrum des "picket-fence"-Porphyrins, gemessen in Benzol/$H_2O$ $C \approx 10^{-5}$ mol/l, Ligand: 2 Methylimidazol

Die Bildung des Sauerstoffkomplexes ist reversibel, er hat eine Halbwertszeit von ca. 15-20 Minuten. Das Spektrum des Sauerstoffkomplexes ($O_2$) unterscheidet sich von dem der fünffach koordinierten Fe(II)-Verbindung (Abb.17) durch eine Intensitätsabnahme der Soretbande und ihrer Verschiebung um 9 nm nach kürzeren Wellenlängen. Dafür tritt im Bereich der Q-Bande eine schwache bathochrome Verschiebung auf, die auch mit einer Abnahme der Intensität einhergeht.

### 3.4. Reduktion des "picket-fence"-Porphyrins

Die Reduktion des "picket-fence"-Porphyrins in apolaren aprotischen Lösungsmitteln bereitet Schwierikgieten. Eine Hydrierung mit Pt/Asbest oder Pd/Aktivkohle ist in Benzol oder Toluol nicht möglich, weil diese Lösungsmittel zu apolar sind. Ebenso bereitet das quantitative Abtrennen des Katalysators Probleme.

Auch die Reduktion mit $Na_2S_2O_4$/Kronenether (80) bringt nicht den gewünschten Erfolg. Zum einen gelangt der sperrige Kronenetherkomplex schlecht an das Aktivzentrum, zum anderen komplexiert überschüssiger Kronenether die zugesetzten Liganden.

Die beste Methode besteht darin, ein Zweiphasensystem zu verwenden. Dabei wird eine wässrige Dithionitlösung mit der Lösung des "picket-fence"-Porphyrins in Toluol versetzt und eine halbe Stunde unter Inertgas gerührt. Die organische Phase wird anschließend über $MgSO_4/Na_2S_2O_4$ getrocknet. Erst zu der reduzierten Lösung werden dann die entsprechenden Liganden gegeben.

### 3.5. Ligandeneinflüsse

#### 3.5.1. Proximale Liganden

Beim Hämoglobin und Myoglobin befindet sich in einer für die Koordination geeigneten konformativen Anordnung proxi-

mal ein Histidin in trans-Stellung zum Sauerstoff, durch das Häm am Globin fixiert ist.
Erst durch diesen fünften Liganden wird die Basizität des Hämeisens so erhöht, daß die Bildung des Sauerstoffadukts möglich wird.

Die σ-Donorstärke des tertiären Imidazolstickstoffs kann jedoch nicht der alleinige Grund für die Überlegenheit des proximalen Histidins gegenüber anderen Stickstoffliganden sein, da aliphatische Amine stärkere σ-Donoren sind; eine ebenso wichtige Rolle dabei spielt die Hybridisierung (33). Beim Imidazol ist eine zusätzliche pπ-dπ-Bindung mit dem Hämeisen möglich, die bei $sp^3$-hybridisierten Stickstoffbasen nicht erfolgen kann (Abbildung 18).

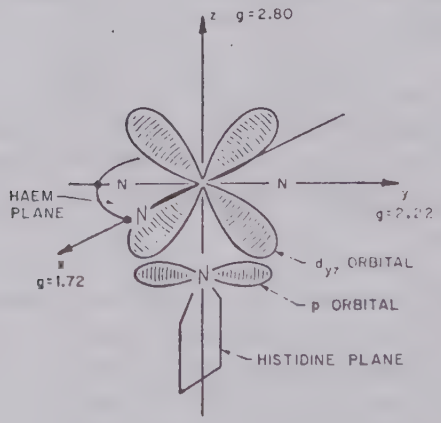



Abbildung 18: Orientierung der Imidazol-Ebene zum Eisenporphyrin (33)

Wie stark das Imidazol am Eisenkomplex gebunden wird, läßt sich auch durch sterische Einflüsse steuern.

Chang und Traylor (62,63) untersuchten, welchen Einfluß auf das Oxygenierungsverhalten die Spannung hat, unter der die koordinative Bindung zwischen Häm und Imidazol steht. Um die von Perutz (9) diskutierte Wechselwirkung der Hämeinheiten im Hämoglobin zu erklären, setzten sie auf unterschiedliche Weise einfache Modellverbindungen unter Spannung:

So ahmten sie die R- und T-Struktur (64) nach, die auch zur Erklärung der Kooperativität im Hb herangezogen wird (65).

Beim "picket-fence"-Porphyrin ist ein solches Vorgehen nicht möglich, da der Ligand extern zugegeben wird. Allerdings lassen sich durch Variation des Imidazols sterisch ähnliche Verhältnisse herstellen.
In polarem oder wässrigem Medium sind die elektronischen Einflüsse (Basizität) aber sicher weit stärker als die sterische Hinderung durch Substituenten (vgl. B. 4.2.).
Wie sich das Oxygenierungsverhalten des "picket-fence"-Porphyrins bei Zusatz unterschiedlicher Liganden ändert, geht aus Tabelle 6 hervor.

Bei der Reduktion bildet sich unter Zusatz von N-Methylimidazol oder Imidazol der sechsfach koordinierte low-spin Komplex, während bei Verwendung von 2-Methylimidazol der fünffach koordinierte high spin-Komplex auftritt.
Daß beim Liganden Z-Leu-His-Leu-OMe kein μ-oxo Dimeres entsteht, ist auf die sterische Hinderung auf beiden Seiten des Eisen-Porphyrins zurückzuführen.

Tabelle 6: Ligandeneinflüsse bei der Oxygenierung von "picket-fence"-Porphyrin.

| Ligand | [L]/[Fe] | Red. | | oxygeniert | oxidiert | ($t_{1/2}$) (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| N-MeIm | 10 | 536 | | 544 | 578 (μ-oxo)<br>504 (oxid) | 50-60 |
| Im | 10 | 534 | | 540 | 576 (μ-oxo) | 1-2 |
| 2-MeIm | 20 | 535 | 560 | 547 | 578 (μ-oxo)<br>504 (oxid) | 20 |
| Z-Leu-His-Leu-OMe | 20 | 535 | | 545 | 504 (oxid) | 30-40 |

[Fe(II)TpivPP] = $5 \times 10^{-5}$ mol/l, $Na_2S_2O_4$/wässr.$C_6H_6$, T = 25°C, unter latm $O_2$

Auch der am Imidazol möglichen N-H-Tautomerie sollte Beachtung geschenkt werden. Bei der Synthese verschiedener histidinhaltiger Peptide konnte gezeigt werden, daß die dem Histidin benachbarten Aminosäuren einen wesentlichen Einfluß auf das Ausmaß der Tautomerie am Imidazolrest haben und die Basizität des Imidazols entscheidend bestimmen (66). Dies ist natürlich auch für die Koordination am Eisen entscheidend (84). Besonders in wässriger Lösung müssen solche Effekte berücksichtigt werden (vgl. B. 3.9. u. 4.2.).

### 3.5.2. Distale Liganden

Distales Histidin scheint zur Bildung des Sauerstoffaduktes nicht unbedingt erforderlich zu sein (68).

Daß es zwischen dem polarisierten Sauerstoff am Häm-Eisen und dem distalen Histidin zu einer Wasserstoffbrückenbindung kommt (69, 9), ist unwahrscheinlich. Gerade in unmittelbarer Nähe des Aktivzentrums muß nämlich ein unpolares, nicht acides Medium vorliegen. Durch Vergleich des Redox-

potentials des Sauerstoffs in aprotischen und protischen Lösungsmitteln zeigten Bayer et al. (33), daß sich die Abwesenheit acider Protonen als günstig erweist. Sie formulierten deshalb einen Donor-Acceptor-Komplex zwischen einem tertiären Stickstoffatom des Imidazols und dem Sauerstoff, der dabei als Acceptor auftritt.

Eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem $Fe^{3+}$-O-$O^-$ und dem Imidazolring (70) kann die Polarität der "Bindung" derart beeinflussen, daß die Koordination des Sauerstoffs und eine Stabilisierung des Komplexes erleichtert wird (Abbildung 19).

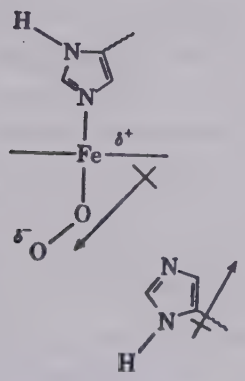



Abbildung 19: Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem distalen Histidin und der Fe-$O_2$-Gruppierung (70)

Denkbar ist, daß auchdie zum Zentrum des "picket-fence"-Porphyrins weisenden Amidgruppen in ortho-Stellung der Phenylringe zu einer solchen Stabilisierung des Sauerstoffkomplexes beitragen. Diese Möglichkeit erwähnt auch Momenteau (71) bei einem Vergleich des Oxygenierungsverhaltens der von ihm vorgestellten "basket-handle"-Porphyrine.

### 3.6. Einfluß der Konzentration des Liganden und Lösungsmitteleffekte.

Die Konzentration des Fe(II)-Porphyrins absolut und im Verhältnis zum Liganden wurde bisher kaum erörtert. Dies hat im wesentlichen drei Gründe:

1) Die Oxygenierung wird mittels UV-Spektroskopie verfolgt. Dies beschränkt die Porphyrinkonzentration normalerweise auf $10^{-6}$ - $10^{-4}$ molare Lösungen.

2) Um Aggregation der Porphyrine zu vermeiden, arbeitet man nach bisherigen Überlegungen in hochverdünnten Lösungen.

3) Nur das Verhältnis ligandenkoordiniertes System zu unkoordiniertem System wird als maßgeblich angesehen. Die absolute Ligandenkonzentration wird kaum beachtet.

Brault und Rougee (86) fanden für TPP bei Verwendung von 2-Methylimidazol als Ligand eine Gleichgewichtskonstante von $k = 2.4 \times 10^4\ mol^{-1}$ für die Bildung des fünffach koordinierten Komplexes nach

$$Fe(II) + L \underset{}{\overset{k}{\rightleftharpoons}} Fe(II)L \ .$$

Über das Massenwirkungsgesetz

$$k = \frac{[Fe(II)L]}{[Fe(II)]\ [L]}$$

ergibt sich bei gegebenem k unter der Voraussetzung, daß sich etwa 95 % fünffach koordiniertes Porphyrin bilden sollen, für die Konzentration des Liganden bei unterschied-

lichen Fe(II)Porphyrinkonzentrationen:

Tabelle 7: Molarer Überschuß des Liganden bei unterschiedlichen Eisenporphyrinkonzentrationen.

| [ Fe II ] | [ L ] | molarer Überschuß an L |
|---|---|---|
| $10^{-6}$ | $790{,}95 \times 10^{-6}$ | 791 |
| $10^{-5}$ | $79{,}95 \times 10^{-5}$ | 80 |
| $10^{-4}$ | $8.85 \times 10^{-4}$ | 9 |
| $10^{-3}$ | $1{,}74 \times 10^{-3}$ | 1,7 |
| $10^{-2}$ | $1{,}03 \times 10^{-2}$ | 1 |

Man erkennt leicht, daß bei höheren Eisenporphyrinkonzentrationen der molare Überschuß an Ligand abnimmt, der angesetzt werden muß, um fünffach koordinierte Komplexe zu erhalten.
Die gleiche Überlegung läßt sich für die Verhältnisse bei der Bildung des sechsfach koordinierten Komplexes anstellen.

Für die Oxygenierungsreaktion bei einem sechsfach koordinierten Komplex nach

$$\text{Fe(II)}\ L_2 \overset{+\ O_2}{\rightleftharpoons} \text{Fe(II)}\ LO_2 + L$$

gilt:

$$k = \frac{[\text{Fe(II)}\ LO_2] \cdot [L]}{[\text{Fe(II)}\ (L)_2]\ [O_2]}$$

Das bedeutet, daß hohe Lignadenkonzentration die Affinität des Eisenkomplexes gegenüber Sauerstoff senken.

Aus diesen Betrachtungen ergeben sich für die Oxygenierung an"picket-fence"-Porphyrinen oder anderen Systemen, bei denen der Ligand extern zugegeben werden muß:

1) Die Konzentration des Eisen(II)-Porphyrins sollte möglichst groß sein.
2) Der Ligandenüberschuß sollte möglichst gering gehalten werden.
3) Liganden, die zur fünffachen Koordination neigen, sind zu bevorzugen.

Durch mögliche Aggregation der Eisenporphyrine und der damit einhergehenden leichteren Bildung von μ-oxo-Dimeren sind der Anwendung solcher Überlegungen Grenzen gesetzt.

Andererseits zeigt Tabelle 7 deutlich, daß die Halbwertszeit der Sauerstoffkomplexe mit höherer Eisenporphyrinkonzentration steigt. Durch Anwendung der Kernresonanzspektroskopie für Oxygenierungsuntersuchungen wäre es möglich, bei höheren Konzentrationen als $10^{-4}$ mol/l zu arbeiten.

Neben der Konzentration und der Art des Liganden beeinflußt auch die Art des Lösungsmittels das Oxygenierungsverhalten von Eisenporphyrinen. Verständlicherweise werden die Verhältnisse recht unklar, wenn das Lösungsmittel selbst am Komplex koordiniert. Dies ist bei DMF, DMSO und offenbar auch bei $CH_2Cl_2$ der Fall. Problemlos läßt sich dagegen in Toluol oder Benzol arbeiten.

### 3.7. Ähnliche Tetraphenylporphyrinderivate

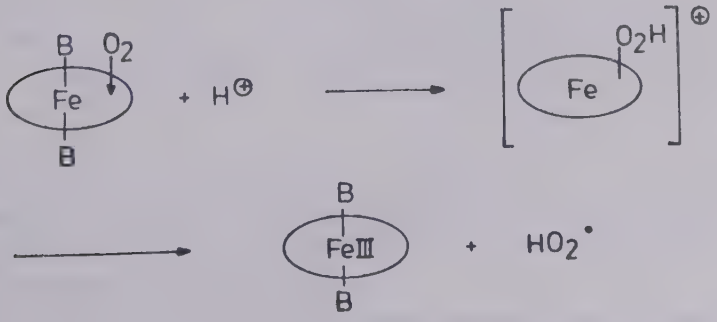
Ist die Leistungsfähigkeit des "picket-fence"-Porphyrins in organischen Lösungsmitteln auch allgemein anerkannt, sind ebenso gute Ergebnisse an ganz ähnlichen Verbindungen doch nicht zu erhalten. So berichtet Vaska (58,59) von "einigen ungewöhnlichen Beobachtungen" bei Oxygenierungs-

untersuchungen am Eisen(II)-[5,10,15,10-(2,4,6-triethoxyphenyl)-porphyrin]: Er stellte fest,daß seine Verbindungen zum Teil mehr Sauerstoff als erwartet (Fe: $O_2$ ≙ 1:1) aufnehmen, also keine Oxygenierung im herkömmlichen Sinne vorliegen kann. Diese Behauptung liesse sich mit dem Argument einer mangelnden Genauigkeit bei der Konzentrationsbestimmung von Sauerstoff entkräften. Andererseits muß aber festgestellt werden, daß Vaska keine μ-oxo-Dimere nachweisen konnte.

Ähnliche Beobachtungen werden in jüngster Zeit viel diskutiert. Castro (61) beschreibt die Oxidation von Hämochromogenen durch Sauerstoff in wässriger Lösung nach einem "outer sphere"-Mechanismus, bei dem keine oxygenierte Zwischenstufe und kein μ-oxo-Dimeres als Endstufe vorliegt.

Nach diesem Mechanismus tritt im ersten Schritt das Sauerstoffmolekül als π-Akzeptor mit dem Porphyrinring in Wechselwirkung:

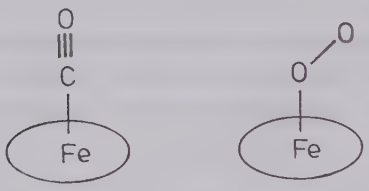
Erst durch die Protonierung des Adduktes erfolgt der Elektronentransfer,und es bildet sich der Eisen(II)-Komplex.



Das schließlich entstehende $H_2O_2$ kann nun weitere Oxidationsprozesse einleiten oder durch Fe(III)-Porphyrine in $H_2O$ und Sauerstoff gespalten werden (Peroxidase).

## 3.8. Weiterentwicklung des "picket-fence"-Porphyrins

Das "picket-fence"-Porphyrin koordiniert CO etwa 200 mal stärker als Hb und Mb (16). Diese starke Affinität wird der linearen Geometrie des CO-Komplexes zugeschrieben.




Collman (72) versuchte nun in jüngster Zeit, das "picket-fence"-Porphyrin so zu modifizieren, daß die Bildung des CO-Komplexes erschwert wird. Mit dem "pocket"-Porphyrin (73) ahmte er die sterischen Verhältnisse in der apolaren Tasche beim Hb besser nach (Abbildung 20).

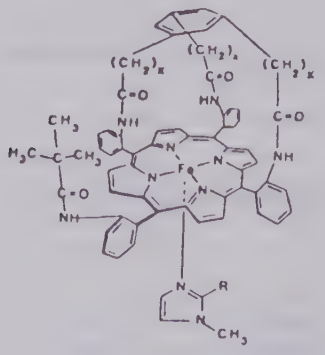


Abbildung 20: Das "pocket-Porphyrin" (73)

Auch beim Hämoglobin wird die Linearität der Fe-CO Einheit durch Wechselwirkungen mit verschiedenen Aminosäureresten gestört (74-77). Beim"pocket"-Porphyrin wird allerdings nur mit sterischen Effekten argumentiert, elektronische Einflüsse werden kaum berücksichtigt. Erwartungsgemäß sinkt bei diesem Modell auch die Affinität gegenüber Sauerstoff, da die Bildung des Sauerstoffkomplexes, wenn auch in geringem Ausmaß, durch sterische Effekte behindert wird.

Interessanter wäre es, in polaren Lösungsmitteln oder in Wasser zu untersuchen, welchen Einfluß z.B. der Zusatz von Salzen oder pH-Änderungen auf die CO- bzw. $O_2$-Affinität hat. Hierfür muß das "picket-fence"-Porphyrin allerdings solubilisiert werden.

### 3.9. Solubilisierung von "picket-fence"-Porphyrin

Der Erfolg des "picket-fence"-Porphyrins in organischen Lösungsmitteln führte dazu, daß auf unterschiedliche Weise versucht wird, dieses Modell zu solubilisieren, um die Oxygenierbarkeit in wässriger Lösung zu untersuchen.

#### 3.9.1. Polymergebundenes "picket-fence"-Porphyrin

Ein theoretisch einfacher Ansatz, um polymergebundenes "picket-fence"-Porphyrin zu erhalten, bestand darin, $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPP(NH_2)_4$ oder das mono-, di- und tri-privaloyl-substituierte Produkt mit Dimethylmalonsäuremonochlorid umzusetzen und anschließend an die freie Carboxylgruppe ein entsprechend funktionalisiertes wasserlösliches Polymer zu binden.

Dieser Versuch mißlang bisher, weil das Säurechlorid der Dimethylmalonsäure zu wenig reaktiv ist, um vollständig bei maximal 10°C mit den ortho-ständigen Aminogruppen des $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPP(NH_2)_4$ zu reagieren.

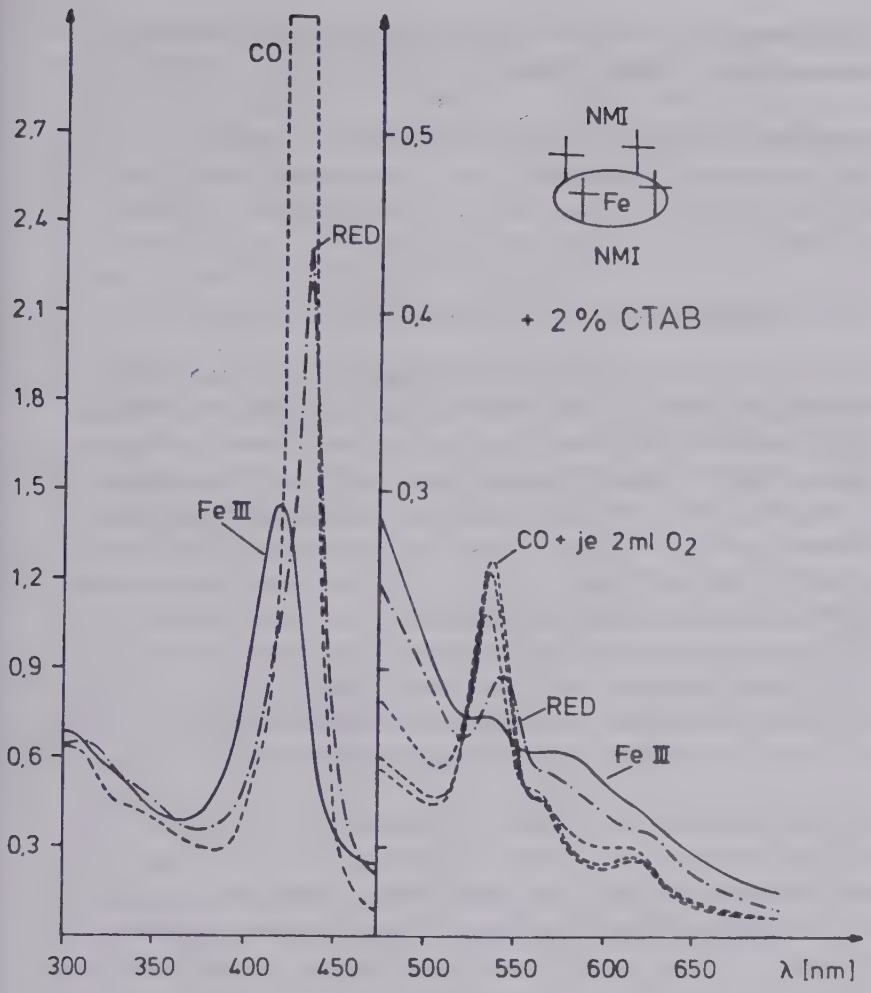
Auch die Kupplung von aminogeschütztem Valin war nicht erfolgreich. Vor diesem Hintergrund muß bezweifelt werden, daß eine Peptidkupplung am $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPP(NH_2)_4$ über ein symmetrisches Anhydrid (42) erfolgreich sein kann.

Versuche "picket-fence"-Porphyrin an polymergebundenes Imidazol oder Blockpolymere zu koordinieren (39) brachten bei Oxygenierungsuntersuchungen nicht den gewünschten Erfolg. Offenbar reicht die Einbettung des "picket-fence"-Porphyrins in das Polymerknäuel nicht aus, um eine genügend hydrophobe Umgebung am aktiven Zentrum zu schaffen. Auch ist fraglich, ob der Ligand genügend basisch ist, um zu koordinieren.

### 3.9.2. Solubilisierung mittels Detergentien

Solubilisiert man "picket-fence"-Porphyrin mit Cetyltrimethylammoniumbromid als Detergenz (63,82,83) erhält man das typische Spektrum des μ-oxo-Dimeren (Abbildung 21). Nach Zugabe eines 500-fachen Überschusses von N-Methylimidazol und Reduktion mit äquivalenten Mengen Dithionit erhält man das UV-Spektrum des reduzierten sechsfach koordinierten Komplexes. Dieser reagiert leicht mit Kohlenmonoxid zum CO-Komplex. Interessanterweise ist dieser CO-Komplex recht instabil: Schon bei Zugabe von 2 $cm^3$ $O_2$ ($\hat{=}$ 40 mm Hg) nimmt die CO-Bande deutlich ab. Der CO Komplex kann so durch successive Zugabe von $O_2$ (Abbildung 21) wieder direkt zum μ-oxo-Dimeren überführt werden. Da dabei eine bathochrome Verschiebung der Q-Bande nicht messbar ist, wird wahrscheinlich die Stufe eines Sauerstoffkomplexes nicht durchlaufen. Auch der reduzierte Komplex reagiert bei Zugabe von 2 ml $O_2$ direkt zum μ-oxo-Dimeren.

Dieses ungünstige Oxygenierungsverhalten ist auf die enge Aggregation der Eisenporphyrine zurückzuführen.




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 419 | 537, 579 |
| Red | 434 | 542 |
| CO | 427 | 536 |

Abbildung 21: UV-Spektren des mit CTAB solubilisierten "picket-fence"-Porphyrins in wässriger Lösung; Ligand: N-Methylimidazol ($c \approx 4 \times 10^{-5}$ Mol/l)

Durch Detergentien werden diese Aggregate nicht zerstört, sondern direkt solubilisiert.

Die entsprechenden Beobachtungen macht man, wenn als Ligand 2-Methylimidazol eingesetzt wird. Allerdings erhält man hier für den reduzierten Komplex die erwartete fünffache Koordination.

3.9.3. Solubilisierung mittels Albumin oder Liposom

Eine Solubilisierung des "picket-fence"-Porphyrins durch Albumin ist leicht durchzuführen. Dabei werden pro Albumin 1,5-2 Porphyrinkomplexe solubilisiert. Wo diese Komplexierung am Protein stattfindet,ist unklar. Allerdings konnte in neuester Zeit gezeigt werden, daß menschliches Serumalbumin (HSA) mindestens in zwei Konformeren auftritt, die gegenüber Deuteroporphyrin IX unterschiedliche Assoziationskonstanten besitzen (81). Das könnte bedeuten, daß so komplexierte Eisen-Porphyrinkomplexe auch eine unterschiedliche Affinität gegenüber Sauerstoff aufweisen.
Auf jeden Fall werden aber Porphyrinaggregate durch HSA zerstört und in apolarer Umgebung komplexiert (81).

Eine Koordination über die Histidylreste des Albumins konnte nicht festgestellt werden. Deswegen ist eine solche Komplexierung nur für Eisen-porphyrine interessant, die ihre Liganden bereits koordiniert oder kovalent gebunden haben.

Der Versuch, die Schwefelbrücken in den 17 Cystinen des HSA zum Teil mit Dithiothreit (82,83) reduktiv zu öffnen und nach Zugabe des Porphyrins wieder zu schließen, führte zu völliger Denaturierung des Albumins.

Bei der Reduktion des mit Albumin komplexierten "picket-fence"-Porphyrins mit $H_2$/Pt-Asbest erfolgt ebenso teil-

weise Denaturierung des Albumins. Beim Arbeiten mit wässriger Dithionitlösung als reduzierendem Agens muß das Dithionit äquimolar zum Eisenporphyrin der Albuminlösung zugesetzt werden, um Reduktionen am Albumin selbst zu vermeiden.

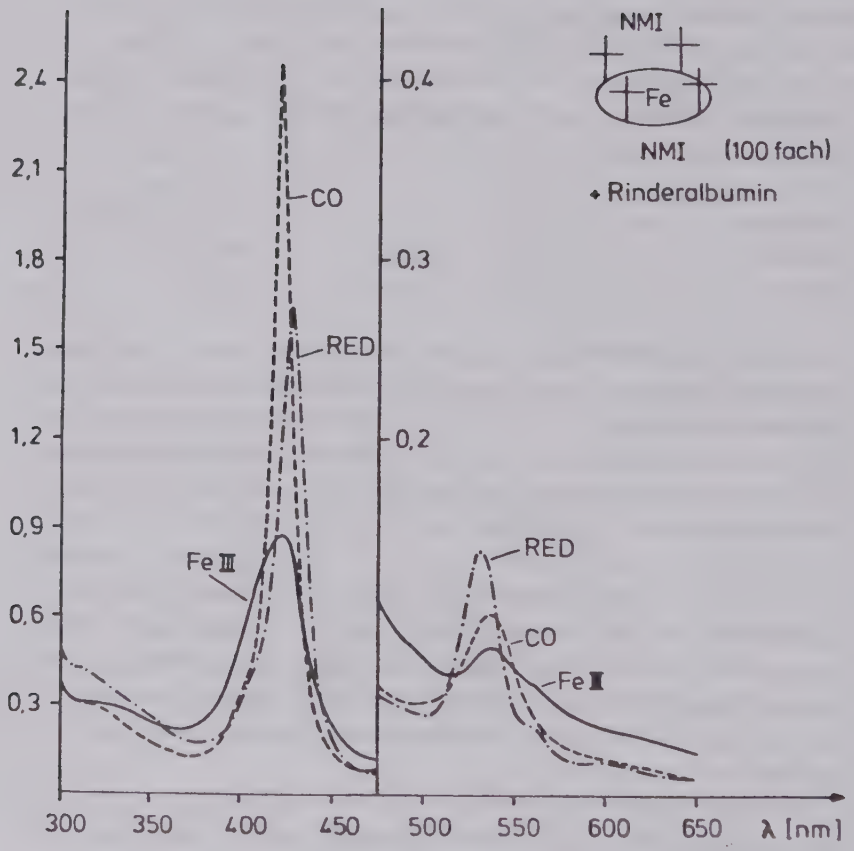
Abbildung 22 und 23 zeigen das Verhalten des mit Albumin komplexierten "picket-fence"-Porphyrins in wässriger Lösung.

Verwendet man N-Methylimidazol als Ligand, erhält man das typische Spektrum eines sechsfach koordinierten Porphyrinsystems (Abbildung 22, Red). Der CO-Komplex (Abbildung 22, CO) ist außerordentlich stabil gegen Sauerstoff. Erst nach zweistündigem Spülen der Lösung mit Stickstoff liegt wieder der CO-freie reduzierte Komplex vor.

Wird die Lösung des Eisen(II)-Komplexes zehn Sekunden mit Sauerstoff gespült (Abbildung 23, $O_2$), zeichnet sich eine Intensitätsabnahme der Q-Bande und eine leichte hypsochrome Verschiebung der Soret-Bande ab. Im Bereich der Soretbande ist diese Verschiebung mit einer Abnahme der Intensität verbunden.

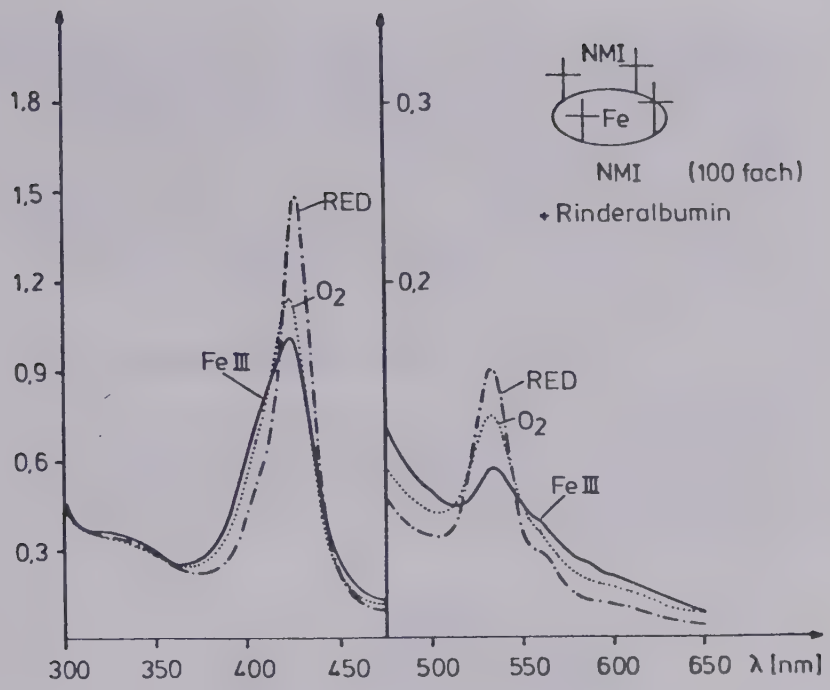
Bei weiterem Einleiten von Sauerstoff erhält man wieder das Spektrum des Eisen(III)-Porphyrins, ohne daß sich ein μ-oxo-Dimeres bildet. Dies ist auf die komplexierenden Eigenschaften des Albumins zurückzuführen, die eine Bildung von Porphyrinaggregaten verhindert.

Versucht man durch Zugabe von DPG die Sauerstoffaffinität des Eisen(II)-Komplexes zu senken, treten keine Veränderungen im Verhalten gegenüber CO oder Sauerstoff auf. Auch diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür, daß Albumin als solubilisierendes Agens wirkt und vorhandene Liganden nicht verdrängt.




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 421 | 537 |
| Red | 428 | 531 |
| CO | 422 | 536 |

Abbildung 22: UV-Spektrum von "picket-fence"-Porphyrin, solubilisiert mit Rinderalbumin in Phosphatpuffer pH 7.4; Ligand: N-Methylimidazol ($c \approx 3{,}5 \times 10^{-5}$ Mol/l)




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 421 | 537 |
| Red | 429 | 531 |
| $O_2$ | 424 | 531 |

Abbildung 23: UV-Spektrum von "picket-fence"-Porphyrin, solublisiert mit Rinderalbumin in Phosphatpuffer pH 7.4
Ligand: N-Methylimidazol ($c \approx 3 \times 10^{-5}$ Mol/l)

Setzt man 2-Methylimidazol als Ligand ein, sollte aufgrund des hohen $pK_a$-Wertes von 8,35 (78) trotz ca. 100-fachen Überschusses kaum eine Koordination bei neutralem pH erfolgen, da die Base protoniert wird. Der $pK_a$-Wert des N-Methylimidazols beträgt 6,95 und liegt damit im Bereich von Histidinderivaten. Trotzdem erhält man hauptsächlich sechsfach koordinierte Komplexe; das bedeutet, daß entweder Imidazolreste von Albumin und $H_2O$ koordiniert werden oder daß nur das Lösungsmittel koordiniert.
Nach einem anderen Prinzip immobilisierte Tsuchida (87-90) das "picket-fence"-Modell.
Das meso-Tetra[αααα(o-pivaloylamidophenyl)porphinato]eisen II-mono-(1-lauryl-2-methylimidazol) wird in Liposom aus Phosphadylcholin komplexiert. ("Liposomal heme", Abbildung 24).

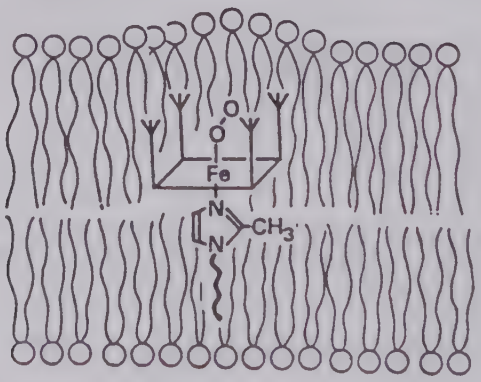



Abbildung 24: "Liposomal heme" nach Tsuchida et al.

Bei Oxygenierungsuntersuchungen an diesem Modell ist es offenbar nicht möglich, im Bereich der Soretbande zu messen. Deshalb kann der Sauerstoffkomplex nur im Bereich der Q-Bande identifiziert werden. Über die Stabilität des CO-Komplexes werden keine Angaben gemacht.

Großer Wert wird bei diesen Untersuchungen darauf gelegt, daß die Oxygenierung in neutralem wässrigen Medium möglich sei. Im Liposomkomplex wird aber auch überschüssiger Ligand eingeschlossen. Deshalb herrscht im Liposom selbst basisches Milieu.
Das bedeutet, daß der Ligand nicht protoniert werden kann und dafür um so besser koordiniert.
Die Oxygenierung findet also im Alkalischen statt.

## 4. Das "tailed picket-fence"-Porphyrin

Für die Synthese eines fünffach koordinierten Eisenporphyrinkomplexes, bei dem es möglich ist, die R- und T-Struktur im Hb nachzuahmen, eignet sich das Konzept des "tailed picket-fence"-Porphyrins (85). Bei diesem Modell ist der fünfte Ligand kovalent am Porphyrinsystem gebunden und die sterische bzw. hydrophobe Umgebung an der Stelle des Sauerstoffangriffs bleibt der des "picket-fence"-Porphyrins ähnlich.

Berücksichtigt man zusätzlich noch die Möglichkeit eines koordinativen Einschlusses durch ein Detergens, Liposom oder Protein, bzw. die kovalente Bindung an ein wasserlösliches Polymer, Polypeptid oder Protein, müßte eine Oxygenierung in wässriger Lösung erfolgreich sein. Durch Verwendung von histidinhaltigen Peptiden und physiologisch verträglichen Polymeren, wie funktionalisiertem Polyethylenglykol, Dextran oder Albumin, könnte so die Grundlage für einen Sauerstoffträger geschaffen werden, der unter physiologischen Bedingungen einsetzbar wäre.

### 4.1. Synthese und Trennung mittels prep. LC

Neben den allgemein schlechten Ausbeuten bei Porphyrinsynthesen ergeben sich aufgrund der statistisch bedingten Verteilung der Atropisomere bei orthosubstituierten TPP-Derivaten besonders ungünstige Verhältnisse, wenn man von

einem bestimmten Isomer ausgehen muß.
Der Synthese- bzw. Trennungsweg zum "tailed picket-fence"-Porphyrin ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.
Man geht dabei von der Atropisomerenmischung des $H_2TPP(NH_2)_4$ aus. Sie enthält aufgrund statistischer Verteilung (vgl.B. 3.1.) 12,5 % $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPP(NH_2)_4$.
Die restlichen Isomere können durch prep. LC (vgl.B. 5.3.1.) abgetrennt werden (Abbildung 26 A).

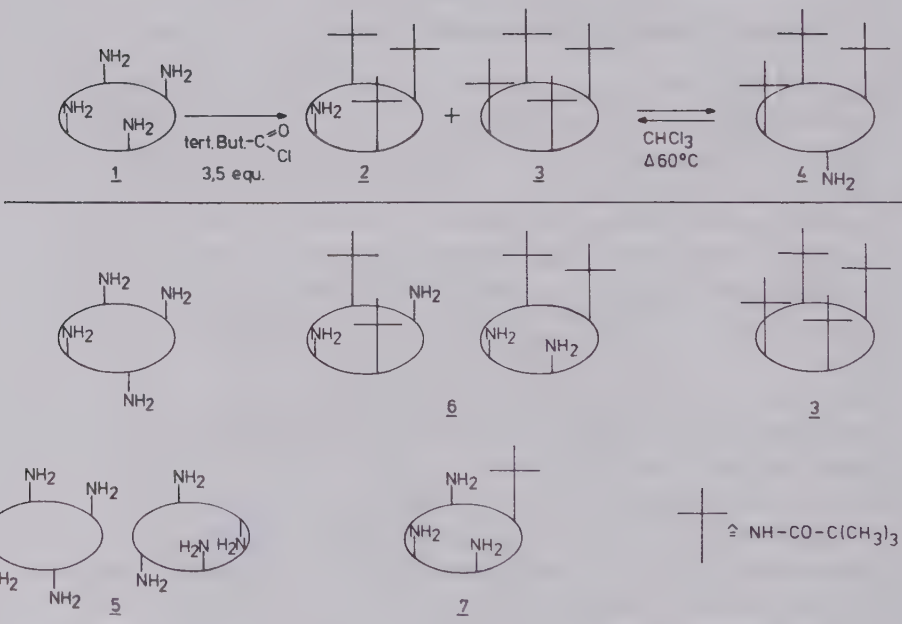


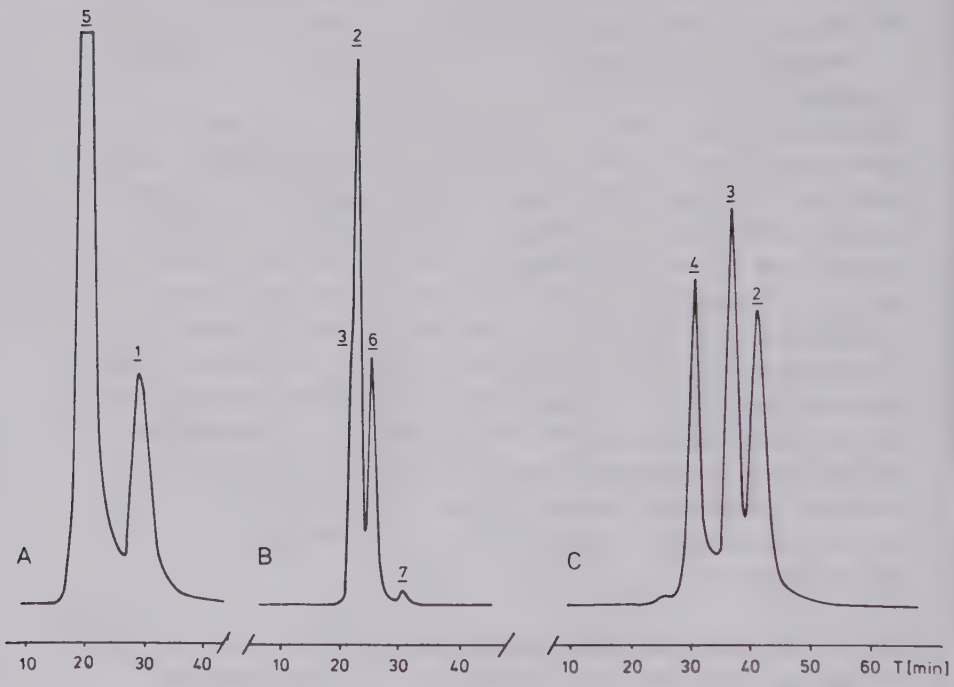

Abbildung 25: Synthese- bzw. Trennungsweg zum "tailed picket-fence"-Porphyrin

Setzt man das $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2TPP(NH_2)_4$ mit 3.5 Äquivalenten Pivaloylchlorid (Piv-Cl) um, erhält man eine Mischung aus ein-, zwei-, drei- und vierfach substituiertem $H_2TPP(NH_2)_4$.
Dieses Gemisch läßt sich in drei Fraktionen trennen: der Hauptfraktion mit vierfach- und der gewünschten dreifach-

substituierten Verbindung (2,3) und zwei Nebenfraktionen mit zwei- bzw. einfach substituiertem Produkt (6,7) (Abbildung 26 B). Die Trennung der drei- und vierfachsubstituierten Substanzen erfolgt ebenso durch prep. LC (Abbildung 26 C). Bei der Reisomerisierung des meso-α-(o-Aminophenyl)-ααα-tris(o-pivaloylamido)phenyl-porphyrins 2 stört das vierfachsubstituierte Produkt 3 nicht, da bei einer Reisomerisierungstemperatur von 60°C die Pivaloylgruppen ein Drehen der Phenylgruppen verhindern (vgl.B. 3.2.). Nur die o-Aminophenylgruppe kann bei dieser Temperatur reisomerisieren, wobei sich etwa das erwartete Verhältnis von 50 % α- und 50 % β-Position einstellt (Abbildung 25 C). Berücksichtig man, daß sich alle abgetrennten Atropisomere mit Ausnahme des $\alpha\alpha\alpha\alpha H_2$TPP $PIV_4$ wieder in den Hauptgang der Synthese einführen lassen, so konnte trotz der statistisch bedingten geringen Ausbeuten ein gangbarer Weg zur Synthese eines "tailed picket-fence"-Porphyrins gefunden werden.

Das $^1$H-NMR-Spektrum des $\alpha\alpha\alpha\beta H_2$TPP $PIV_3$ $NH_2$ zeigt klar die beiden unterschiedlichen Signale für die tert.-Butylgruppen bei 0.05-0.25 ppm. Die Spektren der ein- und zweifachsubstituierten Verbindung wurden bereits vorgestellt (50).

Die kovalente Bindung eines Liganden über eine Amidbindung an die freie Aminogrupe in β-Stellung bereitet große Schwierigkeiten (85). Die üblichen Peptidkupplungsmethoden wie DCCI/HOBT, Anhydrid- und Aktivestermethode oder Azidkupplung führten nicht zum Erfolg. Dies ist der sterisch ungünstigen Lage der ortho-ständigen Aminogruppen in β-Stellung zuzuschreiben. Als einzig gangbarer Weg hat sich deshalb die Kupplung mit einem Säurechlord erwiesen.




| Nr. | Substanz |
|---|---|
| 1 | meso-Tetra(αααα-aminophenyl)porphyrin |
| 2 | meso-Mono(α-o-aminophenyl)tri (ααα-pivaloylamido-phenyl)porphyrin |
| 3 | meso-Tetra(αααα-o-pivaloylamidophenyl)porphyrin |
| 4 | meso-Mono(β-o-aminophenyl)tri(ααα-pivaloylamidophenyl) porphyrin |
| 5 | αβαβ, ααββ und αααβ meso-Tetra(o-aminophenyl)porphyrin |
| 6 | meso-Di(αα-o-aminophenyl) di(αα-pivaloylamidophenyl) porphyrin |
| 7 | meso(Tri(ααα-o-aminophenyl)mono(α-pivaloylamido-phenyl)porphyrin |

Abbildung 26: Chromatogramme der Trennungen zum "tailed picket-fence"-Porphyrin

Kuppelt man auf diese Weise den Liganden als ganzes an die letzte freie Aminogruppe am Porphyrin, ist anschließend ein Eiseneinbau aufgrund der sterischen Hinderung auf beiden Seiten der Porphyrinebene nicht mehr möglich. Deshalb wurde ein "Spacer" eingeführt.

Soll die Synthese über eine Carboxylgruppe weitergeführt werden, ist eine Umsetzung mit Bernsteinsäuremonomethylester-Chlorid mit darauffolgendem Eiseneinbau und Verseifung des Methylesters möglich. Das $^1$H-NMR-Spektrum des meso-Tri(ααα-ortho-pivaloylamidophenyl)-mono(ortho-methoxysuccinylamidophenyl)porphyrins zeigt Abbildung 27.

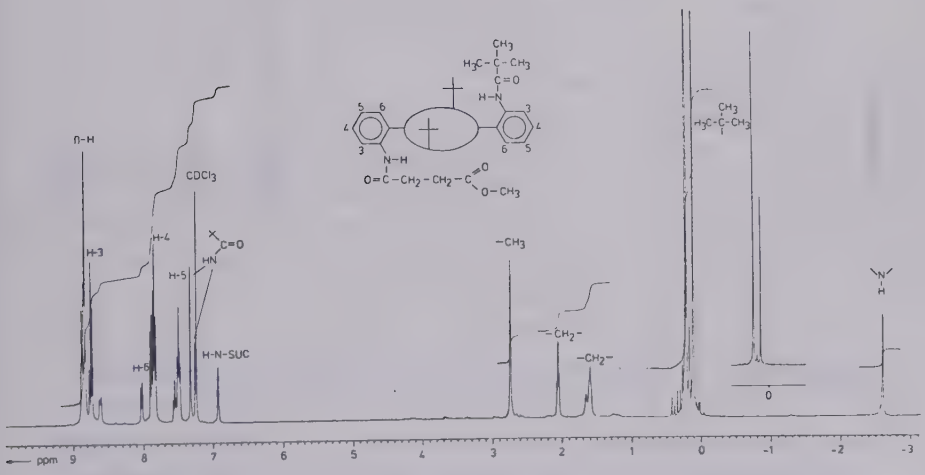



Abbildung 27: $^1$H-NMR-Spektrum von αααβ$H_2$TPP PI$V_3$ Suc-OMe

Da eine weitere Kupplung dann nur über eine Aktivierung der Carboxylgruppe am Eisenporphyrin erfolgen kann, ist

es günstiger, eine freie Aminogruppe am Porphyrin vorzugeben und die aktivierte Carboxylkomponente im Überschuß zuzusetzen. Deshalb wird das $\alpha\alpha\alpha\beta H_2$ TPP $PIV_3(NH_2)$ mit TFA-β-Ala-Cl umgesetzt. Die gelungene Kupplung läßt sich durch das $^1$H-NMR-Spektrum nachweisen (Abbildung 28).

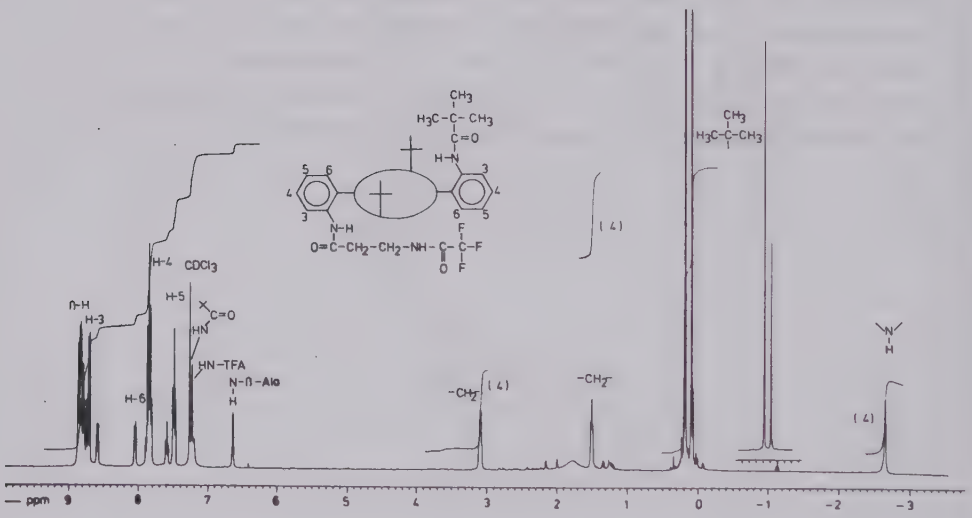



Abbildung 28: $^1$H-NMR-Spektrum von $\alpha\alpha\alpha\beta H_2$TPP $PIV_3$ βAla-TFA

Nach dem Eiseneinbau wird die TFA-Schutzgruppe in Dioxan/2n NaOH abgespalten. Um das sich dabei bildende μ-oxo-Dimere zu zerstören, wird anschließend angesäuert. Die Kupplung mit dem histidinhaltigen Liganden erfolgt dann in neutralem bis leicht basischem Milieu.

In Abbildung 29 wird das resultierende Modell dargestellt. Über die freie Aminogruppe können weitere Aminosäuren oder wasserlösliche Polymere gebunden werden.

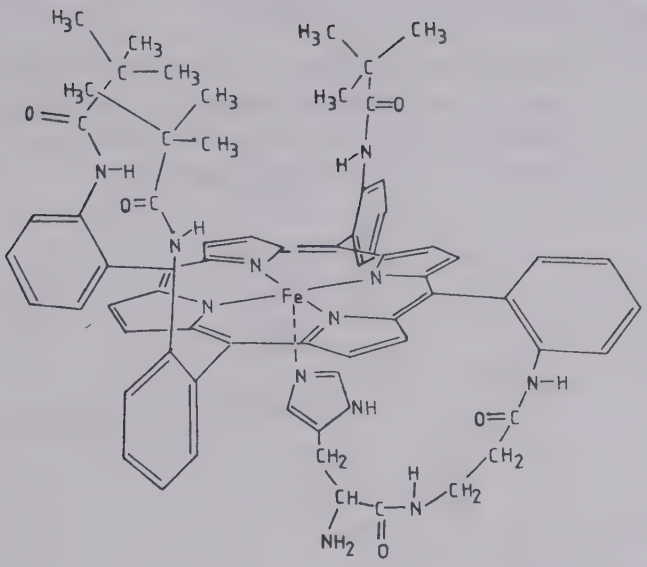


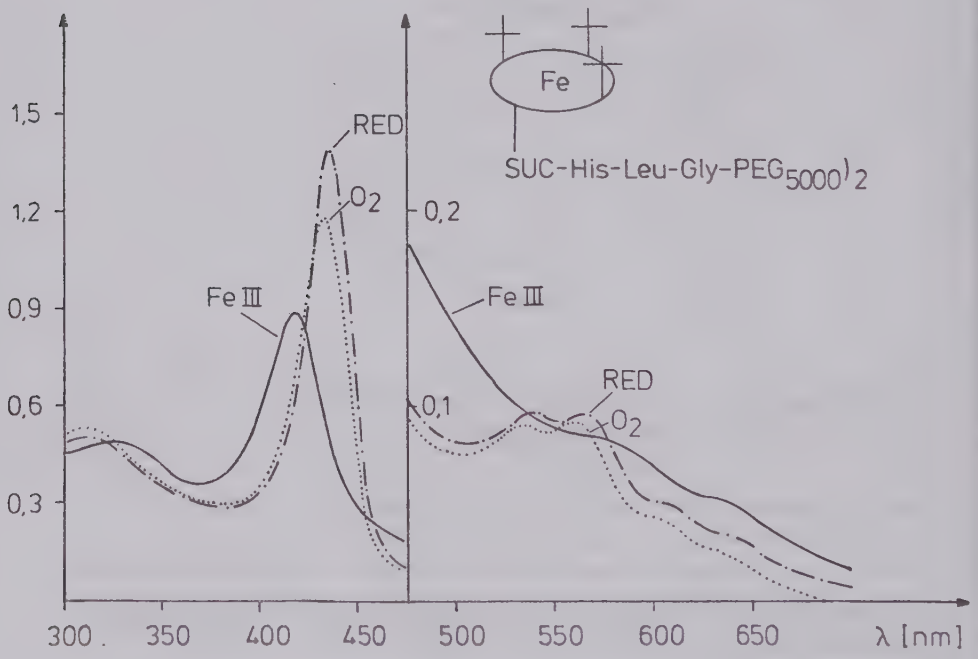
Abbildung 29: "tailed picket-fence"-Porphyrin mit His-βAla als Ligand

Um Nebenreaktionen bei der Histidinkupplung zu vermeiden, wird das Imidazol am Histidin durch die Tritylgruppe geschützt. Als letzter Schritt der Synthese wird diese Schutzgruppe durch Zusatz von TFA abgespalten. Die α-Aminogruppe des Histidins kann während der Synthese auch tritylgeschützt bleiben.

Eine bessere Methode besteht darin, das Histidin vor der Kupplung an das Eisenporphyrin über seine Aminogruppe bereits an weitere Aminosäuren oder an Polymere zu binden. Die Kupplung an das Eisenporphyrin erfolgt mit DCCI/HOBT in Methylenchlorid.

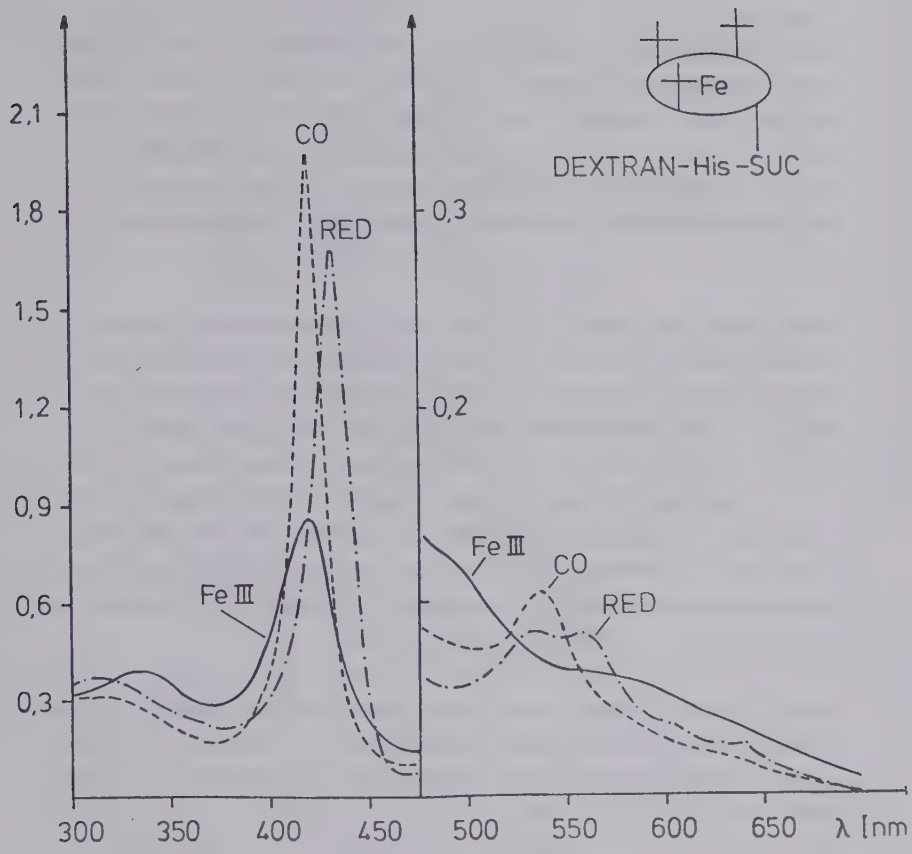
## 4.2. Oxygenierungsverhalten von "tailed picket-fence"-Porphyrinen in wässriger Lösung

Dextran- oder polyethylengebundenes"tailed-picket-fence"-Porphyrin mit Histidin als Liganden zeigen in wässriger Lösung oder in Phosphatpuffer bei pH 7.4 das typische Spektrum eines fünffach koordinierten Komplexes. (Abbildung 30 und 31)




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 417 | 581, 637 |
| Red | 433 | 541, 568 |
| $O_2$ | 431 | 535, 563 |

Abbildung 30: UV-Spektrum von PEG-gebundenem "tailed-picket-fence"-Porphyrin in $H_2O$ ($c \approx 3 \times 10^{-5}$ Mol/l)




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 418 | 575 |
| Red | 432 | 536, 562 |
| CO | 419 | 537 |

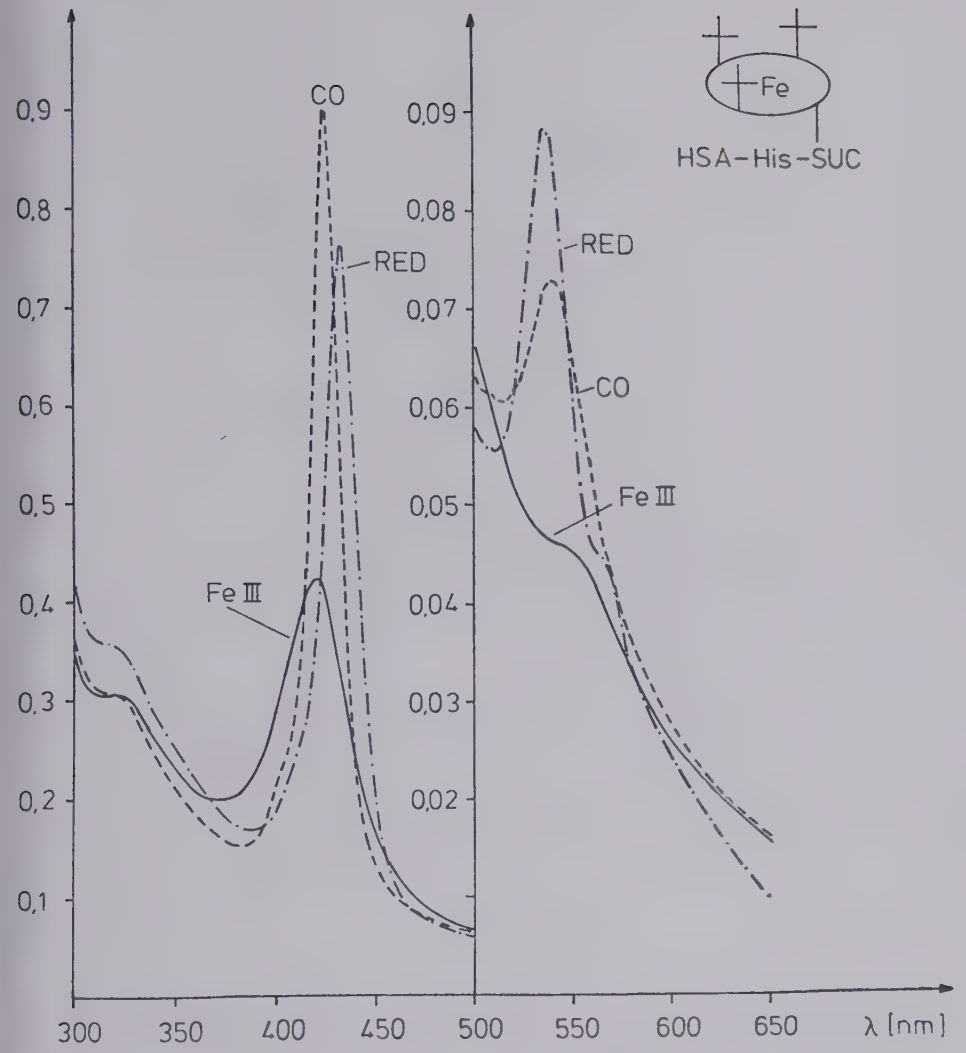
Abbildung 31: UV-Spektrum von Dextran-gebundenem "tailed picket-fence"-Porphyrin in $H_2O$
($c \approx 4 \times 10^{-5}$ Mol/l)

Erstaunlich ist, daß bei diesen Porphyrinderivaten der CO-Komplex gegenüber Sauerstoff nicht sonderlich stabil ist und bereits bei Zugabe von 2 ml (≙ 40 mg Hg) Sauerstoff binnen vier Minuten irreversibel oxidiert wird. Da offenbar die solublisierenden Eigenschaften von Dextran und Polyethylenglykol nicht ausreichen, um eine Aggregation der Porphyrine zu verhindern, wird bei diesen Beispielen als letzte Stufe der Oxidation das μ-oxo-Dimere gebildet.

Das spektrale Verhalten von albumingebundenem "tailed picket-fence"-Porphyrin zeigt Abbildung 32. Im Unterschied zur dextrangebundenen Probe tritt hier im Spektrum eindeutig eine sechsfache Koordination auf (Abbildung 32). Dies ist auf eine direkte Koordination des Albumins am Eisen zurückzuführen, dessen Histidylreste offenbar die Rolle des distalen Histidins immitieren können. Der CO-Komplex ist deshalb auch wesentlich stabiler. Erst nach zweistündigem Spülen mit Stickstoff erhält man wieder das Spektrum der reduzierten Verbindung.

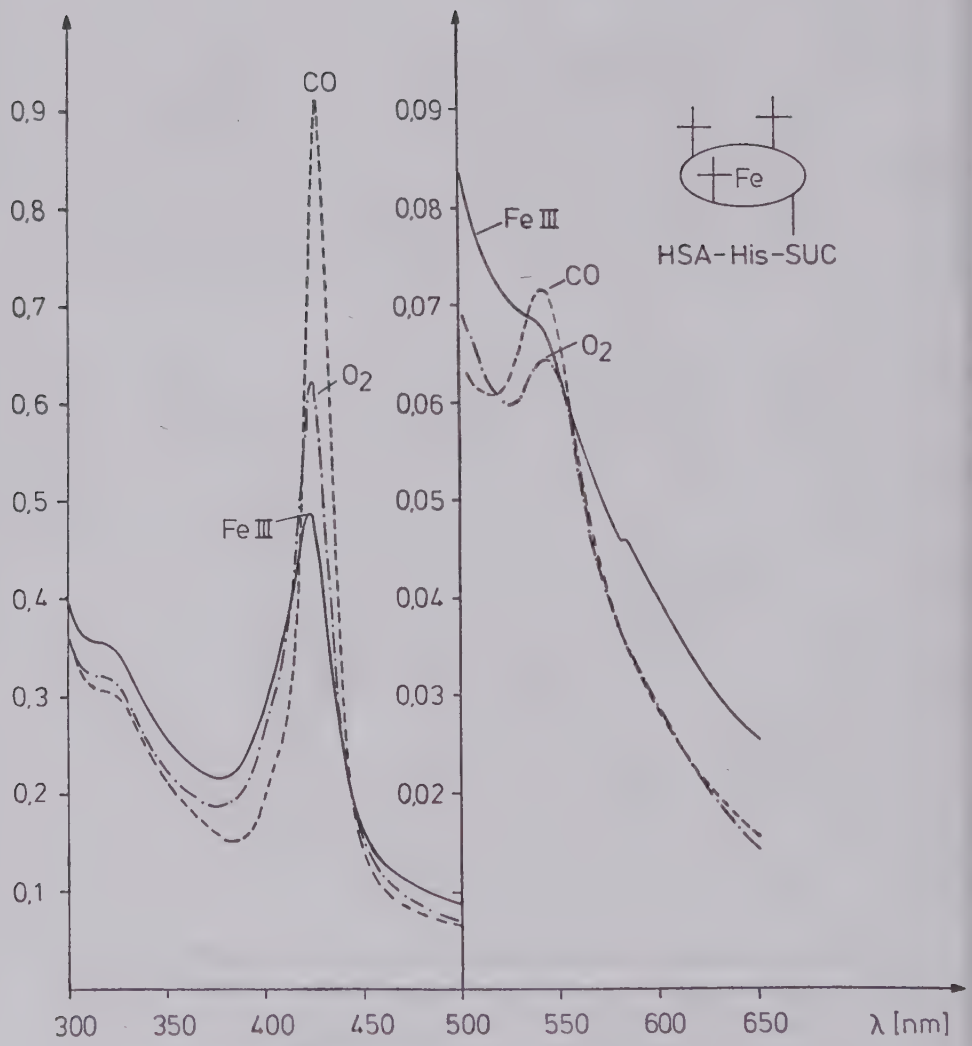
Auch die Stabilität gegenüber Sauerstoff steigt beträchtlich: Nach dreiminütigem Spülen mit Sauerstoff läßt sich eine Zwischenstufe nachweisen, deren Absorbtionsmaximum im Bereich der Soretbande zwischen der des CO-Komplexes und der der Fe(III)-Verbindung liegt. Im Bereich der Q-Bande tritt eine leichte bathochrome Verschiebung auf. Bei erneutem Begasen mit Kohlenmonoxid kann das Spektrum des CO-Komplexes nur unvollständig wieder erhalten werden, so daß auch teilweise Oxidation erfolgt sein muß (Abbildung 33).

Versetzt man reduziertes HSA-Eisenporphyrin bei pH 7.4 portionsweise mit je 2 ml Sauerstoff, erfolgt keine sofortige Oxidation. Im Bereich der Q-Bande läßt sich eine schwache bathochrome Verschiebung nachweisen, die auf ein intermediäres Auftreten des Sauerstoffkomplexes hinweist (Abbildung 34).



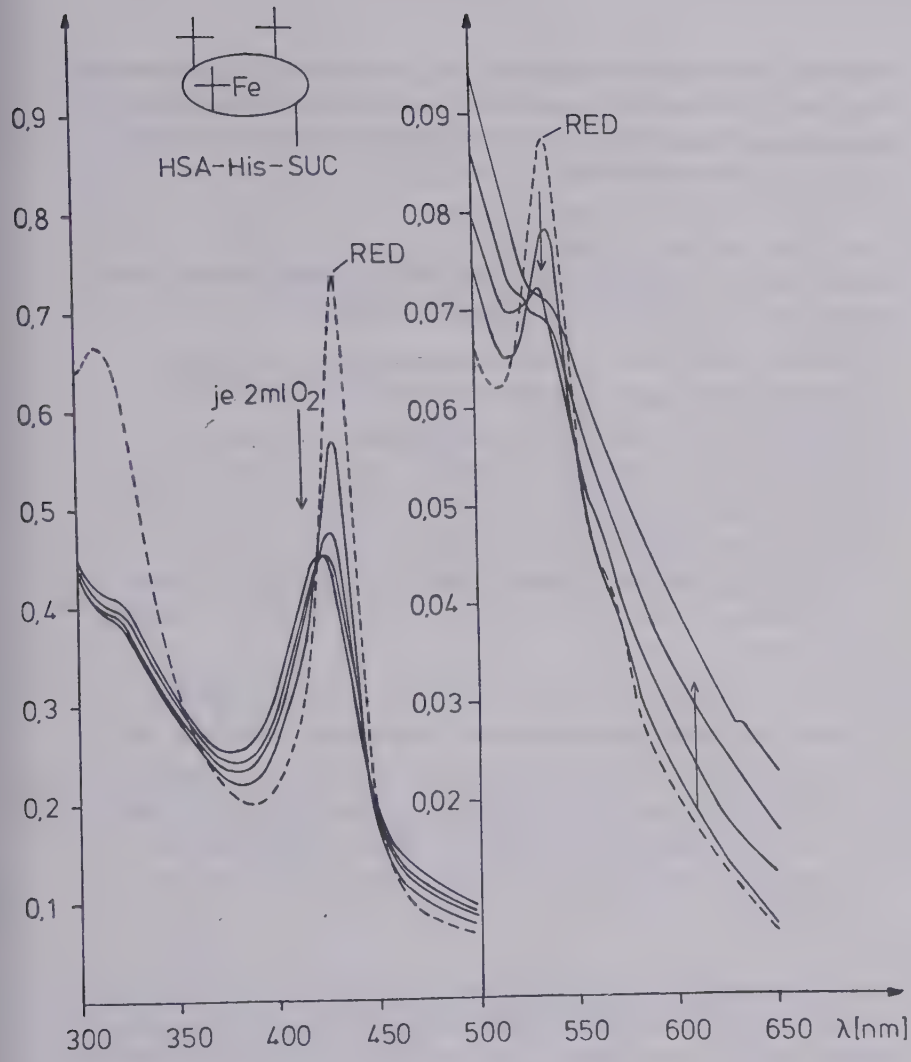

| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 419 | 545 |
| Red | 436 | 540 |
| CO | 431 | 543 |

Abbildung 32: UV-Spektrum von HSA-gebundenem "tailed-picket-fence"-Porphyrin in Phosphatpuffer pH = 7.4 ($c \approx 10^{-5}$ Mol/l)




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Fe III | 419 | 545 |
| CO | 431 | 543 |
| $O_2$ | 427 | 545 |

Abbildung 33: UV-Spektrum von HSA-gebundenem "tailed-picket-fence"-Porphyrin in Phosphatpuffer pH = 7.4 ($c \approx 10^{-5}$ Mol/l)




| | Soret-Bande [nm] | Q-Bande [nm] |
|---|---|---|
| Red | 436 | 539 |
| $O_2$ | 429 | 544 |

Abbildung 34: UV-Spektrum von HSA-gebundenem "tailed picket-fence"-Porphyrin in Phosphatpuffer pH = 7.4 ($c \approx 10^{-5}$ Mol/l)

Aufgrund der gegebenen apparativen Möglichkeiten lassen sich jedoch keine Aussagen über die Halbwertszeit des $O_2$-Komplexes machen. Auch läßt sich eine reversible Oxygenierung nicht nachweisen.

Vergleicht man das Verhalten des dextrangebundenen "tailed picket-fence"-Porphyrins mit dem des an HSA gebundenen, werden die Vorteile des Albumins deutlich:

1) Albumin verhindert eine Aggregation der Porphyrinkomplexe und damit die Bildung von μ-oxo-Dimeren.

2) Albumin ist in der Lage, Histidylreste als distale Liganden zur Verfügung zu stellen. Eine Bindung an HSA erfolgt wahrscheinlich über freie Aminogruppen des Lysins (Nr. 4 und Nr. 533 oder Nr. 535).
Nur bei diesen Positionen liegen im Albumin in direkter Nähe zu Histidylresten entsprechende Reaktionszentren vor.

3) Durch Kupplung von Albumin an "tailed picket-fence"-Porphyrin wird die Stabilität des CO-Komplexes erhöht.

4) Die Stabilität des CO-Komplexes von albumingebundenem "tailed picket-fence"-Porphyrin gegenüber Sauerstoff steht im Einklang zum Verhalten des Hämoglobins und macht das Auftreten eines Sauerstoffkomplexes wahrscheinlich.

Um in wässriger Lösung einen Sauerstoffkomplex mit größerer Halbwertszeit zu erhalten, muß die Basizität des Liganden erhöht werden. Dies kann z.B. durch Verwendung von Methyl-Histidin geschehen. Ebenso ist es günstiger, Histidinderivate ohne Verwendung eines "Spacers" direkt an das "tailed picket-fence"-Porphyrin zu kuppeln, sodaß die Kohlenstoffkette zum Imidazol verkürzt wird. Dies führt zu einer stärkeren Koordination und das Eisen wird weiter aus der Porphyrinebene heraus gezogen.

Langfristig muß auch eine Stabilisierung des Sauerstoffkomplexes durch distale Liganden erreicht werden. Hierfür eignet sich das Konzept des "picket-fence"-Porphyrins besonders, da es möglich ist, selektiv oberhalb und unterhalb der Porphyrinebene Liganden einzuführen.

Albumin könnte dann als reines Trägerprotein eingesetzt werden und weit höher beladen werden als bisher.

## 5. Präparative HPLC

Eine Trennung der Atropisomere zur Synthese des "tailed picket-fence"-Porphyrins konnte bisher nur über die HPLC erreicht werden. Da aber zur Synthese dieser Modellsubstanz Trennungen im präparativen Maßstab erforderlich sind, mußte eine neue Methode für präparative HPLC-Trennungen gefunden werden.

### 5.1. Einführung

Bei der Analytik organischer Substanzen spielt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC eine bedeutende Rolle. Die Vorteile der Methode liegen in Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit bei hohem Trennvermögen. Auch lassen sich kleinste Probenmengen chromatographisch trennen. Sollen die getrennten Substanzen zur weiteren Analyse oder für chemische Umsetzungen im präparativen Maßstab isoliert werden, stößt man auf Schwierigkeiten, da sich hohe Auflösung einer Säule und große Beladungskapazitäten gegenseitig ausschließen (91).

Eine Technik, die beiden Faktoren bei hoher Elutionsgeschwindigkeit und geringem Lösungsmittelverbrauch gerecht wird, stellten Godbille und Devaux vor (92). Die präparative Flüssigkeitschromatographie unter Anwendung einer axialen Kompression der stationären Phase (93) erlaubt häufig eine direkte Übertragung der Bedingungen von Dünnschichtchromatographie (DC) und analytischer HPLC (94).

Diese Technik hat sich für die Trennung verschiedener Porphyringemische im präparativen Maßstab besonders bewährt, da sie neben den genannten Vorteilen auch ein schnelles und problemloses Packen der Säule bei großer Reproduzierbarkeit erlaubt. Dies gewinnt dann Bedeutung, wenn die stationäre Phase nach mehreren Trennungen aufgrund irreversibler Adsorbtion von Begleitsubstanzen oder Zersetzungsprodukten unbrauchbar wird und regeneriert werden muß. Da bei Porphyrinsynthesen immer eine Vielzahl von Nebenprodukten auftreten, die sich aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer Polarität (Chlorine, Phlorine etc.) nur unwesentlich von den zu isolierenden Porphyrinen unterscheiden, sind sie auf normalen LC Säulen schwer von den Porphyrinen zu trennen, zumal die bei der Synthese ebenfalls entstehenden Oligomere häufig über die gesamte Säule verschmieren. Auch liegen die Porphyrine oft als Isomerengemische vor, die schwer zu trennen sind.

## 5.2. Anwendung der prep. LC

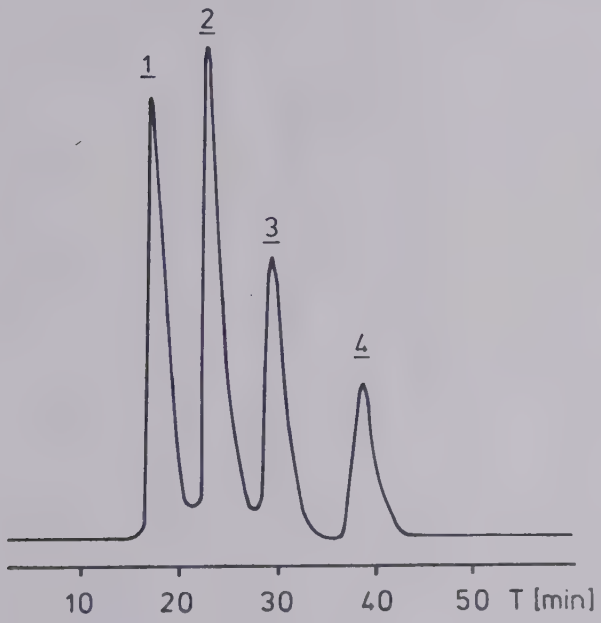
Bei Arbeiten zur Darstellung von substituierten Tetraphenylporphyrinen, "tailed picket-fence"-Porphyrinen und von Atropisomeren des meso-Tetra(orthoaminophenyl)-porphyrins $H_2TPP(NH_2)_4$ ergab sich die Notwendigkeit zur Trennung mittels prep. LC (vgl.B.3.1. und 4.1.).

Außer für die Porphyrintrennungen eignet sich die präparative Flüssigkeitschromatographie auch für andere Problemstellungen (95,98) und konnte bei der Reinigung vollgeschützter Peptide (96,97) angewendet werden.

## 5.3. Säulenqualität bei Verwendung von Kieselgel und RP-18 Material als stationäre Phase.

Um eine Vergleichsmöglichkeit mit der normalen LC herzustellen, wurde ein Testchromatogramm auf Kieselgel Si 60

aufgenommen (Abbildung 35). Die experimentellen Daten und die sich aus dem Chromatogramm ergebenden Parameter zeigt Tabelle 9.




Farbstoffgemisch (Merck)

| | |
|---|---|
| 1 | Ceresrot 7 B |
| 2 | Nitroechtblau 2 B |
| 3 | Nitroechtviolett FBL |
| 4 | Ceresgelb R |

Abbildung 35: Testchromatogramm auf Kieselgel Si 60

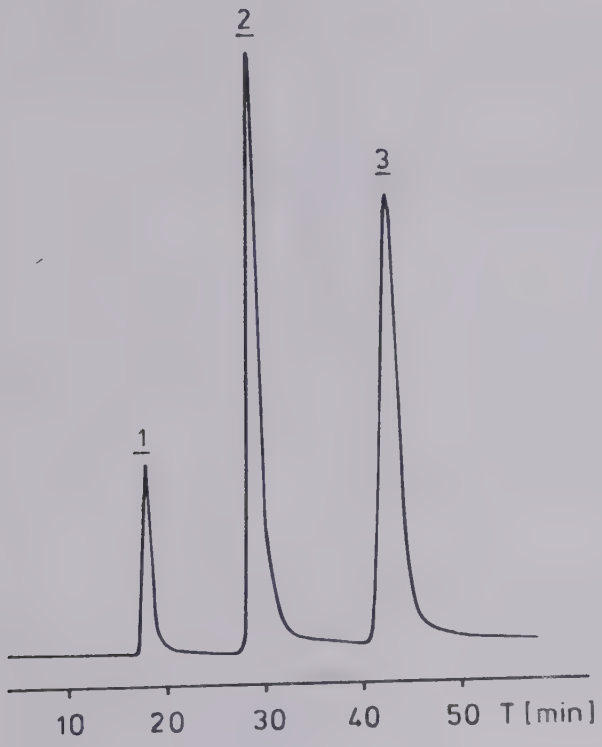
Tabelle 9: Experimentelle Daten und Parameter zum Testchromatogramm Abbildung 35

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| stationäre Phase | 250 g LiChroprep Si 60, 25-40 um | | | |
| Probenmenge | 5 ml Test-Farbstoffgemisch | | | |
| Laufmittel | $CH_2Cl_2$ | | | |
| Flußrate | 22 ml/Min | | | |
| Säulendruck | 9 bar | | | |
| Eluensdruck | 4 bar | | | |
| Detektor UV | 254 nm | | | |
| Peak Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Zahl der theoret. Böden pro Meter | 1300 | 2300 | 3100 | 4800 |
| HETP um | 789 | 440 | 320 | 210 |
| Retentionszeit Min | 18 | 24 | 30.1 | 29.1 |

Die gute Trennleistung der Säule liegt in der besonderen Methode ihrer Packung begründet, die eine homogene und dichtgefüllte Säule gewährleistet.
Wenn eine Trennung mehrfach wiederholt werden muß, ist eine Reproduzierbarkeit der Trennbedingungen unerläßlich. Durch Einstellung des angegebenen Drucks auf der Säule und dem Elutionsmittel ergibt sich erfahrungsgemäß eine konstante Flußrate.

Fand die prep. LC mit Kieselgel als stationäre Phase bereits breite Anwendung (95-98), so liegt eine weitere Stärke dieser Methode in präparativen Trennungen mit RP-Material. Dies wird durch das Testchromatogramm in Abbil-

dung 36 belegt. Tabelle 10 gibt die sich daraus ergebenden Säulenparameter wieder.




Testgemisch: 1 Biphenyl
2 Benzophenon
3 Benzamid

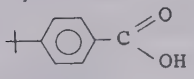
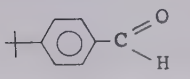
Abbildung 36: Testchromatogramm auf RP-18

Tabelle 10: Experimentelle Daten und Parameter zum Testchromatogramm Abbildung 36

| | | | |
|---|---|---|---|
| stationäre Phase | 250 g RP18, 25-40 um | | |
| Probenmenge | 5 ml Testgemisch | | |
| Laufmittel V/V | $CH_3$-OH/$H_2O$ 9:1 | | |
| Flußrate | 21 ml/Min | | |
| Säulendruck | 9 bar | | |
| Eluensdruck | 3.5 bar | | |
| Detektor UV | 254 nm | | |
| Peak Nr. | 1 | 2 | 3 |
| Zahl der theoret. Böden pro Meter | 4800 | 7600 | 6300 |
| HETP um | 210 | 130 | 160 |
| Retentionszeit Min | 18.2 | 29.2 | 4.3 |
| Testgemisch: | 50 mg Biphenyl, 25 mg Benzophenon und 50 mg Benzamid, gelöst in 15 ml $CH_3OH/H_2O$ 9:1 (v/v) | | |

Mit der Methode der axialen Kompression der stationären Phase können auf RP-18 Material Trennprobleme im präparativen Maßstab gelöst werden. Dies ist besonders interessant für die Trennung ungeschützter Peptide.
Aber auch für andere Substanzgemische konnte die Methode erfolgreich angewandt werden. Als Beispiel wird die Trennung von p-tert.-Butylbenzolsäure und p-tert.-Butylbenzaldehyd aus ihrer Mischung vorgestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Experimentelle Daten zur Trennung von p-tert.-Butylbenzolsäure und p-tert.-Butylbenzaldehyd mittels prep. LC

| | |
|---|---|
| stationäre Phase | 250 g RP-18, 25-40 um |
| Probe | 20 mg p-tert.-Butylbenzdsäure<br>und<br>20 mg p-tert.-Butylbenzaldehyd,<br>gelöst in 1 ml MeOH |
| Eluens v/v | $MeOH/H_2O$ 70:30 |
| Flußrate | 22 ml/Min |
| Säulendruck | 12 bar |
| Eluensdruck | 2 bar |
| Detektor | UV, 254 nm |
| Retentionszeit |  18,4 Min |
| |  66,0 Min |

## 5.4. Beschreibung der Anlage

Die Maschine besteht aus 4 Einheiten (Abbildung 37); alle Teile mit Ausnahme des pneumatischen Teils und der Säulenkühlung sind aus V2A Stahl und Teflon gearbeitet.

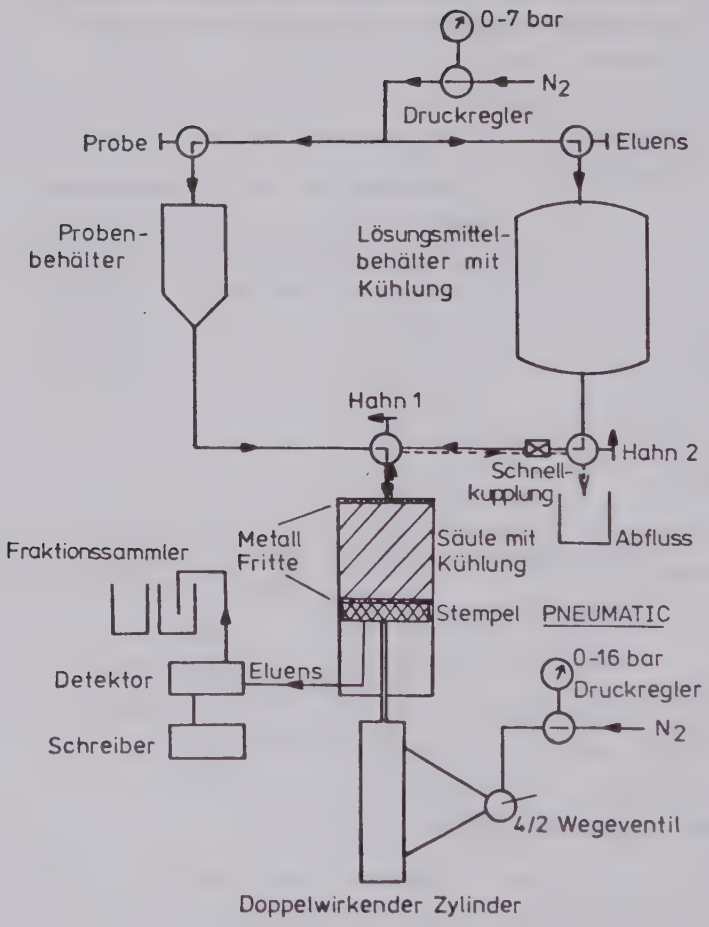



Abbildung 37: Schematische Darstellung der Chromatographie-Anlage (prep. LC-Maschine)

### 5.4.1. Pneumatischer Teil

Der pneumatische Teil besteht aus einem doppelwirkendem Zylinder (Ø 40 mm, L 500 mm) mit Flexokupplung, der über ein 4/2 Wegeventil und ein Druckregelventil (0 - 16 bar) gesteuert wird (FESTO Maschinenfabrik, Esslingen *). Die Pneumatik wird mit Normalstickstoff betrieben, der durch einen Öler geleitet wird. Ein Überdruckventil befindet sich am Reduzierventil der Stickstoffbombe.

### 5.4.2. Säule mit beweglichem Stempel

Die Säule wurde aus einem nahtlos gezogenem V2A Rohr Ø 56 x 8 mm (Denkhaus Edelstahl GmbH, Nagold) gefertigt. Sie hat eine Länge von 500 mm und kann durch einen Aufsatz um 500 mm verlängert werden. Nach dem Honen (Maschinenfabrik Gehring GmbH und Co. KG, Ostfildern-2 *) hat sie einen Innendurchmesser von 41,11 mm.

Der Stempel,die Teflondichtung, die Flansche an der Säule und die Kühlung aus Kupferrohr wurden in der Werkstatt des Instituts für Organische Chemie der Universität Tübingen gefertigt. **
Die Metallfritten im Stempel und im Deckel der Säule wurden mittels einer Presspassung eingesetzt. Dazu wird die Fritte in flüssigem Stickstoff gekühlt und in den Deckel bzw. Stempel locker eingelegt. Beim Ausdehnen paßt sich die Fritte genau in die vorgegebene Fassung ein.
Um eine gleichmäßige Verteilung der Probe und des Eluens auf der Säule zu gewährleisten, sind vor der Fritte im Deckel Verteilschikanen angebracht.

Hinter der Fritte im Stempel ist ein kleiner flacher Trichter eingefräst. Der Ausgang des Trichters mündet in einem dünnen Teflonschlauch, der direkt zum Detektor führt.

---

Fußnoten s.S. 74 unten

5.4.3. Probenbehälter und Eluenstank mit Thermostatisierung

Probenbehälter und Eluenstank (J. Mehrer GmbH u. Co. Maschinenfabrik, Balingen *) werden über ein Druckregelventil 0-7 bar (FESTO Maschinenfabrik, Esslingen) mit 2 Edelstahlhähnen (Eluens und Probe) unabhängig voneinander unter Druck gesetzt. Als Inertgas wird Dreiringstickstoff verwendet. Die Steuerung des Proben- bzw. Eluensflusses erfolgt über 2 L-Edelstahlhähne (Withey, B.E.S.T. Ventil und Fitting GmbH, Stuttgart).

5.4.4. Detektor und Fraktionssammler

Als Detektor wurde ein Gilson Holochrome Spektralphotometer (Quarzzelle, 2 µl Volumen, 0,5 mm Lichtung) in Verbindung mit einem Gilson Fraktionssammler verwandt. ***
Ebenso kann ein UV-Detektor der Firma Isco Modell VA 5 mit Wellenlängen $\lambda$ = 254, 280, 365 oder 579 nm eingesetzt werden. Die Quarzzelle hat bei diesem Gerät einen Lichtweg von 1 mm.

5.4.5. Als stationäre Phase wurden eingesetzt:

- TLC-Kieselgel 60 H, mittlere Korngröße 15 µm (Firma Merck)
- LiChroprep Si 60, Korngröße 25-40 µm (Firma Merck)
- RP-18 Material mittlere Korngröße 25-40 µm (99).

---

* Den genannten Firmen danke ich für Hochschulspenden.

** Herrn Kannwischer und Herrn M. Norz danke ich für die Durchführung aller Metallarbeiten und für viele technische Hinweise bzw. Anregungen.

*** Die genannten Geräte waren Vorführgeräte der Firma Abimed (Düsseldorf).
Herrn J. Moegelin danke ich für seine Einführung in ihren Gebrauch.

### 5.4.6. Eluens und Probenlösung

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach den üblichen Vorschriften (104) getrocknet und gereinigt. Die Proben wurden in definierter Konzentration als Lösung eingesetzt.

## 5.5. Funktionsweise und Bedienung

Die Funktionsweise wird in Abbildung 38 schematisch dargestellt. Eine genaue Bedienungsanleitung wurde ausgearbeitet.

### 5.5.1. Packen der Säule

Zum Füllen der Säule wird der Deckel mit dem Probengefäß vom Kopf der Säule entfernt und der bewegliche Stempel pneumatisch gesenkt. Die entgaste Suspension aus stationärer Phase (ca. 250 g) und Eluens (ca. 500 ml) wird über einen Trichter in die Säule gefüllt (Abbildung 38 A).

Bevor sich die stationäre Phase absetzt, wird die Säule geschlossen und der Stempel langsam nach oben gefahren (Abbildung 38 B). Während dieses Vorgangs wird die stationäre Phase zusammen gepresst und das überschüssige Lösungsmittel entweicht über Hahn 1 und 2 (Abbildung 37 gestrichelter Weg), sowie über den Detektor zum Fraktionssammler. Wenn der Druck auf der Säule den gewünschten Wert erreicht hat (8 - 12 bar) und kein Lösungsmittel mehr abfließt, ist die Säule fertig gepackt; die Probe kann aufgegeben werden.

### 5.5.2. Probenaufgabe und Elution

Unter Normaldruck wird das Probengefäß mit einer Lösung definierter Konzentration (maximal 50 ml) gefüllt und geschlossen. Anschließend legt man den erforderlichen Druck (0.5-8 bar) am Probengefäß und am Eluenstank an.

Durch Umlegen von Hahn 1 (Abbildung 37) kann jetzt eine bestimmte Probenmenge aufgegeben oder eluiert werden. Die Flußrate soll dabei 20-30 ml/Minute betragen, was durch den Druck im Probengefäß und im Eluenstank gesteuert wird.

### 5.5.3. Leeren der Säule

Nach mehreren Durchgängen kann ein Leeren der Säule erforderlich werden. Dazu wird der Deckel und das Probengefäß entfernt. Dann wird der Stempel in der Säule pneumatisch nach oben gefahren. Dabei wird die zusammengepreßte stationäre Phase aus der Säule gedrückt und in einem Rohr aufgefangen (Abbildung 38 C).

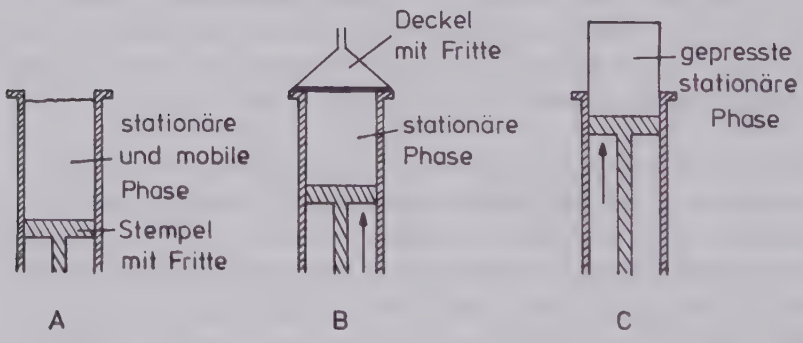



Abbildung 38: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer prep. LC-Anlage

A : Füllen der Säule
B : Kompression der stationären Phase
C : Leeren der Säule

# C. EXPERIMENTELLER TEIL

## 1. Allgemeines

Die angegebenen Ausbeuten wurden für die aufgearbeiteten bzw. gereinigten Substanzen bestimmt.

Die Schmelzpunkte der einzelnen Verbindungen wurden mit einer Schmelzpunktsapparatur nach Tottoli gemessen; die Werte sind unkorrigiert.

Die Daten der Elementaranalysen unterliegen der bekannten Ungenauigkeit. Durch die hohe thermische Stabilität der Porphyrine und ihre Neigung zu Metallkomplexbildung sind die Werte für den Kohlenstoffgehalt häufig zu gering (100).

### 1.1. Geräte

| | |
|---|---|
| Methoden zur Oxygenierung: | Dissertation G. Holzbach (101) und G. Gaßmann (102) |
| UV/VIS: | Beckman Acta M VII |
| IR*: | Beckman-Spektrometer IR 12 und 4250 |
| NMR*: | Bruker WM 400, WH 90, HFX 90 und WP 80 |
| MS*: | Varian MAT 711 |
| Elementaranalyse*: | Perkin Elmer 240 |
| Aminosäureanalysator*: | Biotronic LC 6000 |
| HPLC*: | Hewlett/Packard 1084 B Liquid Chromatograph |
| UV-Detector: | Hewlett/Packard 1040 A HPLC Detection System |

| | |
|---|---|
| prep. LC Maschine: | Eigenbau vgl. B. 5.. |
| Detektoren für die prep. LC: | vgl. B. 5.4.4. |
| Schmelzpunktbestimmung: | TYP SMP, Fa. Büchi |
| pH-Meter und Dosimat: | Metrohm, Herisau |
| Lyophilisator: | Cont. Free ze Dryer New Brunswick |
| Ultrafiltrationszellen: | Fa. Amicon Oosterhout |

---

*

Für die Aufnahme der Spektren und die Durchführung der Messungen danke ich Herrn Dr. K. Albert (NMR), den Mitarbeitern der NMR-Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen, Frau M. Munari (ASA), Herrn J. Wurmstich (EA), Herrn H. Bartholomä (MS), Frau U. Förstel (IR) und Herrn Dipl.-Chemiker A. Paulus (HPLC).

Frau Munari danke ich sehr herzlich für das Zeichnen vieler Abbildungen zu diese Arbeit.

---

## 1.2. Chemikalien

| | |
|---|---|
| Grundchemikalien und Reagenzien: | Fa. Merck, Fa. Merck-Schuchardt, Fa. Fluka, Fa. Ega |
| Lösungsmittel: | Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach (103,104) getrocknet und gereinigt. |
| Gase: | Bei Arbeiten unter Schutzgas wurde Argon oder Dreiringstickstoff (Messer-Griesheim) verwendet. Diese Gase wurden zusätzlich über Oxisorb (105) gereinigt. |
| Dünnschichtplatten: | Kieselgel 60 $F_{254}$, Kieselgel 6 (Fa. Merck) |
| Säulenmaterial: | vgl. B. 5.4.5.<br>Kieselgel Si60 0.040-0.063 mm (Fa. Merck)<br>Kieselgel Si60 0.063-0.2 mm (Fa. Machery und Nagel)<br>Aluminiumoxid basisch (Fa. Merck) |
| Sephadex Molekularsiebe: | Fa. Pharmacia |
| Diaflomembran: | UM-2 Fa. Amicon |
| Spezielle Chemikalien: | Polyethylenglykol (Fa. Höchst)<br>18-Krone-6 (Fa. Ega)<br>DPG (Fa. Boehringer, Mannheim)<br>Dithiothreit (Fa. Serva) |

Den Behringwerken danke ich für kostenloses Serumalbumin.

## 2. Allgemeine Arbeitsmethoden *

### 2.1. Dünnschichtchromatographie

Die Laufmittel für die DC-Kontrolle sind beiden einzelnen Syntheseschritten jeweils angegeben.
Folgende Anfärbereagentien wurden verwandt:

| | |
|---|---|
| Fluram: | auf Aminogruppen (106) |
| Ninhydrin: | auf Aminogruppen (107) |
| Chlor-Tolidin: | auf Peptidbindungen (107) |
| Dragendorff-Bürger-Reagenz: | auf PEG (107) |
| Pauly-Reagenz: | auf Histidin bzw. Imidazol (108) |
| Bromkresolgrün: | auf Carboxylgruppen (107) |

Porphyrine werden durch ihre Eigenfarbe identifiziert. Bei "picket-fence"-Porphyrinen tritt bei 366 nm eine Fluoreszens auf, die die entsprechenden Eisenderivate nicht zeigen.

### 2.2. Aminosäureanalysen

Ca. 0.5 µmol - 1 µmol Peptid bzw. Polymerpeptid werden mit 3 ml 6 nHCl versetzt und in einer verschlossenen Glasampulle 24 h bei 110° C hydrolysiert (115,116). Nach dem Abziehen der Salzsäure wird mit Puffer aufgenommen und ein Teil mit dem Aminosäureanalysator bestimmt.

---

* Den Studenten des organischen Praktikums für Diplomchemiker danke ich für die gute Zusammenarbeit während meiner Assistententätigkeit.

## 2.3. Eiseneinbau in "picket-fence"-Porphyrine

Ca. 1 g Porphyrin und 0.3 ml Pyridin werden in 70 ml frisch destilliertem THF gelöst.
Die Lösung wird mit Inertgas gespült und nach Zugabe von ca. 1 g wasserfreiem $FeBr_2$ 1-5 Stunden am Rückfluß erhitzt. Der Fortgang der Reaktion wird qualitativ nach 2.3.1. verfolgt.
Ist kein freies Porphyrin mehr nachzuweisen, wird die Lösung einrotiert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird über basisches Aluminiumoxid mit Chloroform chromatographiert. Die erste und zweite Fraktion (Fe(III)-Porphyrin und μ-oxo-Dimeres) werden vereinigt und mit 0.3 ml konzentrierter HBr-Lösung behandelt. Anschließend wird über $Na_2SO_4$ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Die Ausbeuten liegen zwischen 40 und 75 %.

### 2.3.1. Bestimmung des Eisengehaltes

Qualitativ läßt sich der gelungene Eiseneinbau in Porphyrinsysteme leicht nachweisen: Säuert man eine Lösung des Eisenporphyrins in THF mit HBr an, darf eine Grünfärbung durch entstehendes Porphyrindikation nicht auftreten, sondern die Lösung muß ihre braune Färbung behalten.
Quantitative Eisenbestimmung (117,118):
5 mg des Eisenporphyrins bzw. 50-100 mg polymergebundenes Eisenporphyrin werden durch möglichst wenig konzentrierte Schwefelsäure und einige Tropfen Wasserstoffperoxid oxidativ zerstört. Man erhitzt noch eine Stunde auf 100°C und überführt die klare Lösung (unter Umständen filtrieren) in einen 25 ml Meßkolben. Mit 25%-iger Natriumacetatlösung wird der pH-Wert auf 3,5 eingestellt. 2 ml 10%-ige Hydroxylaminhydrochloridlösung reduzieren das $Fe^{3+}$ zu $Fe^{2+}$. Nun gibt man 1 ml einer 0.5 %-igen Lösung von 1,10-Phenathrolinhydrochlorid in Wasser zu und läßt eine Stunde stehen. Durch colorimetrische Auswertung der Bande bei 505 nm berechnet sich die Eisenkonzentration $C_{Fe}$ mit  = 11000 und

der gefundenen Extinktion E nach $C_{Fe} = E/_{.d}$ [Mol/l].

## 2.4. Reduktion und Oxygenierungsuntersuchungen an Eisenporphyrinsystemen

### 2.4.1. Reduktion durch einen Dithionit-Kronenether-komplex (80)

Die Reduktion wird in einer 0,5 cm Spezial-Quarzküvette, die mit "doppelt geschützter Gummikappe", seitlichem Sekurieransatz und einem weiteren seitlich angebrachten Reaktionskölbchen versehen ist, durchgeführt (101).
Die Spezialküvette wird so in ein Stativ eingespannt, daß das Reaktionskölbchen nach unten zeigt. Nun wird das Kölbchen nacheinander mit einem kleinen Rührfisch, 7 mg (0,04 mMol) Natriumdithionit und 26 mg (0,1 mMol) 18-Krone-6 beschickt. Man verschließt mit dem Gummiseptum, verdrängt durch abwechselndes Evakuieren und Begasen mit Stickstoff die Luft, injiziert durch das Septum 4 ml absolutes, $N_2$-gesättigtes Methanol und rührt die Lösung bei Raumtemperatur solange, bis das Dithionit völlig gelöst ist. Durch vorsichtiges Evakuieren wird dann das Methanol vollständig abgezogen.

Daneben wird soviel Porphyrin in dem gewünschten, $N_2$-gesättigten Lösungsmittel gelöst, daß die Extinktion der Lösung beim Vermessen in der 0,5 cm Küvette einen Wert von E = 2 nicht übersteigt. 3 ml dieser Lösung werden durch das Septum zu dem jeweils frisch hergestellten Dithionit-Kronenetherkomplex gegeben. Die erfolgreiche Reduktion des Eisenporphyrins zeigt sich in einem Farbumschlag nach rot.

### 2.4.2. Reduktion mit $Pd/H_2$

Ein 25 ml Dreihalskolben wird über eine G-3 Fritte mit einer 1 cm Quarzküvette verbunden. Seitlich befindet sich

ein Sekurieransatz, in der Mitte bietet sich eine Möglichkeit zur Beschickung des Kolbens.
Die Lösung des Porphyrins wird zusammen mit 200 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle in den Kolben eingebracht und durch Evakuieren und Begasen mit Stickstoff sauerstoffrei gemacht. Unter heftigem Rühren wird die Lösung dann 2 Std. mit Wasserstoff gespült. Nachdem der $H_2$-Einlaß entfernt wurde, wird an den gesamten Kolbeninhalt ein geringfügiges Vakuum angelegt. Man kippt die Lösung auf die Fritte und filtriert direkt in die Küvette, indem der Kolbeninhalt vorsichtig wieder mit Stickstoff begast wird.

### 2.4.3. Heterogene Reduktion

5 ml einer ca. $10^{-5}$ molaren Lösung von Eisen(III)-Porphyrin in Toluol oder Benzol werden mit 2 ml $H_2O$ versetzt.
Die Suspension wird sorgfältig mit Inertgas gespült. Anschließend werden unter Inertgas 5-10 mg Natriumdithionit zugegeben. Unter ständigem Spülen mit Stickstoff wird 1/2 Std. kräftig gerührt. Dann wird die organische Phase direkt in die Küvette dekantiert und vermessen.
Soll wasserfrei gearbeitet werden, muß die Lösung vorher noch über $MgSO_4$ getrocknet werden.
Da das Eisenporphyrin dabei leicht wieder oxidiert, sollte dem Trockenmittel etwas festes Dithionit beigemengt werden.

### 2.4.4. Oxygenierungsuntersuchungen an Eisenporphyrinen (101)

Bei Oxygenierungsuntersuchungen an Eisenporphyrinen wurden die UV-Spektren unter den Bedingungen aufgenommen:

| | |
|---|---|
| Scan-Speed | 2 nm/sec |
| Chart | 50 nm/inch |
| Period | 2 |
| Meßbereich | 300-700 nm |

Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1.) Das Spektrum des Eisen(III)- Porphyrins wurde vermessen.

2.) Das Spektrum der reduzierten Verbindung wurde aufgenommen.

3.) Nach Zugabe von 5 ml CO wurde der CO-Komplex vermessen.

4.) Die Stabilität des CO-Komplexes gegenüber $N_2$ wurde geprüft.

5.) Die Stabilität des CO-Komplexes gegenüber $O_2$ wurde untersucht.

Trat bei diesen Messungen ein gegen $O_2$ längere Zeit stabiler CO-Komplex auf, wurde erneut eine Lösung gleicher Eisenporphyrinkonzentration reduziert und mit $O_2$ behandelt.

Entstand dabei ein Sauerstoffkomplex, wurde dieser wieder in den CO-Komplex überführt.
Eine Oxygenierung liegt nur dann vor, wenn das Spektrum des CO-Komplexes nach der Behandlung mit $O_2$ identisch mit dem Spektrum ist, das durch direktes Begasen des Eisen(II)-Porphyrins mit CO erhalten wurde.

## 3. Aminosäurederivate und Peptidsynthesen

### 3.1. Aminosäurederivate

Folgende Aminosäurederivate wurden nach den in Klammern angegebenen Literaturstellen synthetisiert. Die Schmelzpunkte und Drehwerte entsprechen innerhalb geringer Toleranzen den Literaturangaben.

| | |
|---|---|
| H-His-OMe x 2 HCl | (109) |
| H-His-OMe | (112) |
| H-His(TRT )-OMe x HCl | (110) |
| H-Leu-OMe | (123) |

| | |
|---|---|
| Z-Gly-OH, Z-Leu-OH | (DCHA-Salz) |
| Z-Val-OH | (111) |
| BOC-Leu-OH | (121,122) |
| Trichloressigsäurepentachlorphenylester | (127,129) |
| BOC-Leu-OPCP | (127,128) |

3.1.1. TFA-β-Ala-Cl (analog 130,131)

TFA-β-Ala-OH

4.5 g (0,1 Mol) β-Alanin werden in der 10-15-fachen Gewichtsmenge wasserfreier Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Anschließend wird auf -10°C abgekühlt und unter Rühren 1,2 Mol TFA-anhydrid innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Dann rührt man die Lösung erst eine halbe Stunde bei -10°C und eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dem Einrotieren wird in absolutem Ether aufgenommen und von nicht umgesetztem β-Alanin abfiltriert. Schließlich wird aus Toluol/PE(60/90) umkristallisiert. F.-Pkt.: 115°C. Ausbeute: 89 % d.Theorie.

TFA-β-Ala-Cl

Zu einer Suspension von 1 g (5,4 mMol) TFA-β-Ala-OH in 25 ml absolutem Benzol werden 1,75 g ≙ 1,1 ml (14,6 mMol) Thionylchlorid gegeben. Man erhitzt die Lösung 2 1/2 Std. unter Rückfluß.
Anschließend wird das Lösungsmittel und das Thionylchlorid am Rotationsverdampfer abgezogen, die Kristalle in Benzol aufgenommen und erneut vom Lösungsmittel befreit. Dann löst man in 90 ml Benzol, filtriert heiß und versetzt nach dem Abkühlen mit 60 ml PE(60/90).
Nach dem Auskristallisieren wird über eine Glasfritte G3

filtriert und das Produkt mit PE gewaschen.
Fp.: 119°C
Ausbeute: 31 % d. Theorie.

3.2. Synthese des Peptids Z-Leu-His-Leu-OMe

Z-Leu-His-OMe

Zu einer Lösung von 16.9 g (0.1 Mol) H-His-OMe und 21.6 g (0.10 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 100 ml abs. Essigester und 20 ml Acetonitril werden 26.5 g (0.1 Mol) Z-Leu-OH, gelöst in 200 ml abs. Essigester, auf einmal zugegeben und das bald zu einer Gallerte erstarrende Gemisch während 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Stehenlassen über Nacht wird aus der krümeligen Masse das Lösungsmittel so gut wie möglich abgesaugt (unter mehrmaligem Zerreiben des Filterrückstandes mit Essigester) und im Vakuum bei 90°C getrocknet. Man erhält 47.8 g eines Gemisches von Dicyclohexylharnstoff und Dipeptid, aus welchem letzteres mit drei Portionen von je 50 ml kaltem Methanol herausgelöst wird. Die vereinigten Extrakte enthalten noch geringe Mengen von Dicyclohexylharnstoff und werden durch Lösen in Methanol und erneutes Ausfällen mit Essigester/Petroläther gereinigt. Man erhält 29.3 g Z-Leu-His-OMe (70.5 % d. Theorie). Fp.: 131-132° C.

Z-Leu-His-NH-$NH_2$

10 g (0.024 Mol) Z-Leu-His-OMe, in 40 ml abs. Ethanol gelöst, versetzt man mit 3 ml Hydrazinhydrat und läßt während 2 Tagen bei Zimmertemperatur reagieren. Das Lösungsmittel wird bei 40° C im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit 100 ml Wasser verrieben. Nach einstündigem Stehen bei 0° C filtriert man vom kristallinen Niederschlag ab, wäscht portionsweise mit 20 ml Wasser nach und trocknet das rohe Hydrazid über Schwefelsäure und $P_2O_5$. Die Kristallisation

aus 100 ml siedendem Wasser ergibt 6.8 g (68 %) reines Z-Leu-His-NH-$NH_2$, F. 168 bis 169° C.

Das Hydrazid ist in kaltem Ethanol und Methanol, sowie in kalter 1n-Salzsäure gut löslich, dagegen nur in warmem Aceton; in Essigester ist es unlöslich.

Z-Leu-His-Leu-OMe

Zu 1.73 g Z-Leu-His-NH-$NH_2$ (4 mMol), gelöst in 10 ml DMF, werden bei -20° C 7 ml einer 2.8 n HCl/THF-Lösung und 0.5 ml t-Butylnitrit (4.3 mMol) gegeben und 30 Min. gerührt. Anschließend wird mit Triethylamin neutralisiert (ca. 3 ml).

Zu der Lösung des Azids werden 4.4 mMol Leu-OMe, gelöst in $CHCl_3$, hinzugefügt und 3 Tage bei 0° C gerührt. Die Lösung wird einrotiert und in $CHCl_3$ aufgenommen. Dann wird die organische Phase mit 2 %-iger $NaHCO_3$-Lösung und 2 mal mit Wasser gewaschen.
Die getrocknete, eingeengte Lösung wird über Kieselgel (Säule 2 x 20 cm) mit $CHCl_3$/MeOH (10/1) chromatographiert. Die Fraktion zwischen 70 und 120 ml wird einrotiert und aus MeOH/$CHCl_3$/Petrolether (30/50) umkristallisiert.
Ausbeute: 0.32 g (14 % d. Theorie)
Schmelzpunkt: 181-182° C
ASA: Leu : His = 2.00 : 1.14
$R_f$-Wert 0.45 ($CHCl_3$/MeOH = 10/1)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Elementaranalyse: | ber.: | C 61.2 % | H 7.4 % | N 13.2 % |
| | gef.: | C 61.0 % | H 7.3 % | N 13.1 % |

## 3.3. Abspaltung der Schutzgruppen

### 3.3.1. Die Z-Abspaltung

Die Hydrierung der Z-Schutzgruppe am Polymerpeptid wurde in einer 10 %-igen methanolischen Lösung durchgeführt, die bei

1 mMol funktionellen Gruppen mit 4 ml Eisessig und 0.4 g Pd C-Katalysator versetzt wurde. Die Hydrierdauer beträgt ungefähr vier Stunden. Nach Beendigung der Reaktion wurde vom Katalysator abfiltriert und einrotiert. Dann wurde das Polymerpeptid aus $CH_2Cl_2$ mit Ether umgefällt. Bei niedermolekularen Porphyrinderivaten wurde aus $CHCl_3$/ Heptan umkristallisiert.

### 3.3.2. Die Boc-Abspaltung

Eine 10 %-ige Lösung des Polymerpeptids in TFA/$CH_2Cl_2$ (1/1) oder 1,2 n HCl/HAC wurde 30 Minuten bei RT gerührt. Dann wurde das polymergebundene Peptid mit Ether gefällt, abfiltriert und mit Ether gewaschen. Nach zweimaligem Umfällen aus $CH_2Cl_2$ oder Ethanol wurde es im Vakuum getrocknet.

### 3.3.3. Die TFA-Abspaltung

Eine 5 %-ige Porphyrin-Peptidlösung in Dioxan wird mit dem gleichen Volumen einer 2 n NaOH-Lösung versetzt und 2 h gerührt. Anschließend wird mit HCl neutralisiert. Dabei fällt das Porphyrin-Peptid aus und wird umkristallisiert. Fällt das Porphyrin nicht aus, kann entweder mit $H_2O$ versetzt werden, oder die Lösung wird einrotiert, mit $CHCl_3$ aufgenommen und gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase wird aus $CHCl_3$/Heptan umkristallisiert.

### 3.3.4. Alkalische Verseifung von Methylestern

Die alkalische Verseifung von Porphyrinpeptidmethylestern erfolgt analog der TFA-Abspaltung (3.3.3.).

# 4. Derivate wasserlöslicher Polymere und Proteine

## 4.1. Funktionalisierung von Dextran (119,120)

### 4.1.1. Dextran-Carbonat

Einer konzentrierten Lösung von getrocknetem Dextran in absolutem DMSO (5 g = 0.11 mMol in 50 ml) werden 15 ml Dioxan und 25 ml Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wird auf 10° C gekühlt. Unter starkem Rühren werden 1.1 ml Chlorameisensäureethylester (11.5 mMol) in 5 ml absolutem Dioxan so langsam zugetropft, daß die Reaktionstemperatur 10° C nicht überschreitet. Die Reaktionsmischung wird noch 5 Minuten gerührt und anschl. langsam unter Kühlung mit 5 n HCl neutralisiert. Die Reaktionslösung wird dann unter Rühren in 1 l 90 %-iges Ethanol gegossen. Dextran-Carbonat fällt aus, wird abfiltriert, mit Ethanol und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das Produkt in 50 ml DMSO gelöst und wie oben beschrieben gefällt und isoliert. Die Ausbeute an Dextran-Carbonat beträgt 4.7 g.

### 4.1.2. Aminodextran

Frisch hergestelltes Dextran-Carbonat wird in DMSO gelöst (5 g in 45 ml DMSO) und einer Reaktionsmischung aus DMSO, $H_2O$ und Ethylendiamin (50 ml/13 ml/13 ml) unter Rühren zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird unter Rühren in 1 l Ethanol gegossen. Amino-Dextran fällt aus, wird abfiltriert,mit Ethanol und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung wird das Produkt in 50-70 ml DMSO gelöst und wie oben beschrieben gefällt und isoliert. Die Umfällung wird nochmals wiederholt. Die Ausbeute an Aminodextran beträgt 4.6 g oder 86 % bezogen auf Dextran.
Elementaranalyse: C 40.99 H 6.27 N 0.77

Anzahl der Aminogruppen pro Molekül: 12.9
Mittleres Molekulargewicht pro Aminogruppe: 3 490
Substitutionsgrad: 4.6 % der Glucoseringe sind substituiert.

## 4.2. Synthese von $(H\text{-Leu-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$

### 4.2.1. $(H\text{-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$

$(H\text{-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$ wurde nach der Liquid-Phase-Methode dargestellt (124-126).
Beladung: 93 % (ASA)

### 4.2.2. $(H\text{-Leu-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$

2 g ( 0.2 mMol) $(H\text{-Gly-PEG}_{5000})_2 \times 2\ HCl$ werden in 80 ml $CH_2Cl_2$ gelöst und mit 0.5 g ( 1.0 mMol) BOC-Leu(OPCP) versetzt. Nach Zugabe von 0.2 ml N-Methylmorpholin wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird eingeengt und das Polymerpeptid mit Ether gefällt, abgenutscht und mit kaltem Ether gewaschen.
Die BOC-Gruppe wird in HCl/HAc abgespalten. Aus der eingeengten Lösung fällt man das Polymerpeptid erneut mit Ether.
Beladung: 96 % (ASA)

## 5. Porphyrinsynthesen

### 5.1. Bromo[meso-tetra(αααα-ortho-pivaloylamidophenyl) porphyrin]Eisen III ("picket-fence"-Porphyrin) vgl. (15)

#### 5.1.1. meso-Tetra(ortho-nitrophenyl)-porphyrin $H_2TPP(NO_2)_4$ (50)

Zu einer ca. 70° C warmen Lösung von 101 g (0.67 Mol) ortho-Nitrobenzaldehyd in 2 l Eisessig werden langsam 46,5 ml (0.67 Mol) frisch destilliertes Pyrrol getropft. Dabei soll die Temperatur nicht wesentlich ansteigen (exotherme Reaktion).

Die entstehende dunkle Lösung wird 15-20 Minuten unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird rasch abgekühlt. Um das Ausfallen störender Nebenprodukte zu vermeiden, werden zu der noch warmen Lösung 300 ml Chloroform gegeben und weiter rasch auf Raumtemperatur gekühlt.

Die abgekühlte Lösung wird abgenutscht und das ausgefallene kristalline Rohprodukt sorgfältig mit $CHCl_3$ gewaschen bis das Filtrat beinahe farblos ist. Das Produkt wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute: 14 % d. Theorie.
Elementaranalyse: ber.: C 65.84 % H 4.24 % N 13.97 %
gef.: C 65.18 % H 4.00 % N 13.55 %
UV/VIS-Spektrum in DMF
$\lambda$ max = 649, 591, 548, 515, 417 nm
$IR_{KBr}$ = 1530, 1350 $cm^{-1}$ ($-NO_2$ Gruppe)

#### 5.1.2. meso-Tetra(orthoaminophenyl) porphyrin $H_2TPP(NH_2)_4$ (50)

In einem 4 l Dreihalskolben werden 12 g $H_2TPP(NO_2)_4$ (vgl. 5.1.1.) in 600 ml konz. HCl gelöst und ein Überschuß von

$SnCl_2 \times 2\ H_2O$ (50 g) hinzugegeben. Die entstehende grüne Lösung wird 25 Minuten lang auf 65-70° C erhitzt. Anschliessend wird mit konz. $NH_3$ vorsichtig neutralisiert. Die braune Lösung wird bis zur Trockne einrotiert. Aus dem Rückstand wird das $H_2TPP(NH_2)_4$ mit Aceton in einem Soxlett-Extraktor gewonnen.
Die Lösung des $H_2TPP(NH_2)_4$ wird erneut einrotiert und der Rückstand in 300 ml $CHCl_3$ aufgenommen. Die Lösung wird 2 mal mit 200 ml 10 %-igem wässrigem Ammoniak und 2 mal mit je 200 ml Wasser gewaschen und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Gibt man zu der filtrierten und eingeengten Lösung portionsweise 100 ml n-Heptan und engt die Lösung nach jeder Zugabe etwas ein, kristallisiert das dunkelviolette $H_2TPP(NH_2)_4$ aus und kann abfiltriert werden. Versetzt man das Filtrat erneut mit n-Heptan, läßt sich eine Nachfällung erhalten. Haupt- und Nachfällung werden mit n-Heptan gewaschen und im Hochvakuum über $CaCl_2$ getrocknet.
Ausbeute: 92 %
Elementaranalyse: ber.: C 78.5 % H 5.05 % N 16.6 %
gef.: C 77.9 % H 5.1 % N 16.2 %
UV/VIS-Spektrum in DMF
$\lambda$ max = 653, 593, 549, 515, 420 nm
$IR_{KBe}$ = 3350, 1625, 810 $cm^{-1}$ ($-NH_2$ Gruppe)
$R_f$-Werte der vier Atropisomere, Kieselgel Si 60, Benzol/Ether 1/1

| | |
|---|---|
| αβαβ | 0.87 |
| ααββ | 0.75 |
| αααβ | 0.40 |
| αααα | 0.02 |

5.1.3. meso-Tetra(αααα-o-aminophenyl)porphyrin, αααα$H_2$TPP$(NH_2)_4$-

Die Trennung der Atropisomere des $H_2TPP(NH_2)_4$ erfolgt durch mehrmalige Flüssigkeitschromatographie (50). Um eine zu lange Verweilzeit der Isomere auf der Säule und damit eine

mögliche Reisomerisierung zu vermeiden, werden kurze Säulen (Länge 300 mm, Ø 50 mm) verwendet und bei 4° C mit vorgekühlten Lösungsmitteln gearbeitet. Die Säule wird mit Kieselgel Si 60/Chloroform beschickt und es werden 15 g $H_2TPP(NH_2)_4$ in konzentr. Lösung aufgetragen.
Zur Abtrennung des αααα Isomers werden zunächst αβαβ- und ααββ $H_2TPP(NH_2)_4$ mit $CHCl_3$ eluiert. Anschließend wird das αααβ Isomer mit $CHCl_3$/Ether 1:1 entfernt. Das zurückbleibende αααα Atropisomer wird mit Ether/Aceton (1/1) ausgewaschen und nochmals mit Benzol/Ether (1:1) chromatographiert. Beim Einrotieren der Eluate des αααα $H_2TPP(NH_2)_4$ darf eine Temperatur von 5° C nicht überschritten werden, da sonst Reisomerisierung stattfindet.
Durch Erhitzen in $CHCl_3$ unter Stickstoff lassen sich die abgetrennten Atropisomere wieder reisomerisieren.
Ausbeute: 10,1 % αααα $H_2TPP(NH_2)_4$
Elementaranalyse: ber.: C 78.5 % H 5.05 % N 16.6 %
gef.: C 77.9 % H 5.1 % N 16.2 %

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) : δ(ppm) = 8,88 (S, 8H, β-Pyrrol), 7,0-7,9 (m, 16H, Phenyl), 3,47 (S, 8H, $-NH_2$), - 2,61 (S, 2H, innere -NH)

Eine Trennung ist aber auch isokratisch über die prep-LC Apparatur möglich (vgl. A. 5. und B.2.3.1.):

Probenmenge: 1 g in 15 ml Laufmittel
Laufmittel v/v: $CH_2Cl_2/(CH_3)_2CH-OH$ 9/1
Flußrate ml/Min: 25
Säulendruck: 8 bar
Eluensdruck: 2 bar
stat. Phase: 250 g LiChroprep 25-40 µm
Detektor UV λ = 550 nm
Retentionszeit
αααα $H_2TPP(am)_4$ : 30 Min
restliche Isomere: 21,4 Min
Vgl. Abbildung 25 A

5.1.4. aaaa meso-Tetra(orthopivaloylamidophenyl)-porphyrin, aaaa $H_2TPP(PIV)_4$

Zu einer Lösung von 350 mg (0,52 mM) aaaa $H_2TPP(NH_2)_4$ in 100 ml Methylenchlorid gibt man 0,2 ml Pyridin. Bei 2° C tropft man 0,44 ml (3,5 mM) Pivaloylchlorid, gelöst in 10 ml $CH_2Cl_2$ so zu, daß keine Grünfärbung der Lösung auftritt. Nach 1 h bringt man die Lösung auf Raumtemperatur und läßt eine Stunde rühren.
Danach wird die Reaktion abgebrochen, indem man überschüssiges Pivaloylchlorid mit 10 %-iger wässriger Ammoniaklösung zerstört und auswäscht. Nach 2-maligem Waschen mit je 100 ml $H_2O$ wird die Lösung über $Na_2SO_4$ getrocknet, einrotiert und aus $CHCl_3$ Heptan umkristallisiert.
Ausbeute: 86 %
Elementaranalyse: ber.: C 76.2 % H 6.6 % N 11.2 %
gef.: C 74.6 % H 6.7 % N 11.0 %

$^1$H-NMR ($CDCl_3$): δ(ppm) = 8.82 (S, 8H, β-Pyrrol), 7,20 (S, 4H, -amido), 7,39-8,84 (m, 16H, PHenyl), 0,87 (S, 36H, t-Butyl), - 2,54 (S, 2H, innere NH)

Die entsprechende Umsetzung wurde auch mit Acetylchlorid und iso-Buttersäurechlorid durchgeführt.
Das aaaa $H_2TPP(Ac)_4$ läßt sich bei 90° C reisomerisieren. Die Trennung des Isomerengemisches erfolgt durch prep. LC. Die experimentellen Daten zur Trennung und Identifizierung der Atropisomere sind in B. 2.3.1. zusammengefaßt.

5.1.5. Brom,meso-tetra(aaaa ortho-pivaloylamidophenyl) porphyrin] Eisen (III)

Der Eiseneinbau erfolgt analog C. 2.3.
Ausbeute: 70 %
Elementaranalyse:
ber.: C 65.3 % H 5.4 % N 9.45 % Br 6.9 %
gef.: C 65.45 % H 5.7 % N 9.5 % Br 7.0 %

## 5.2. "tailed picket-fence"-Porphyrin

### 5.2.1. meso-Tri(ααα ortho-pivaloylamidophenyl)mono (α aminophenyl)-porpyhrin αααα $H_2TPP\ PIV_3(NH_2)$

Bei 0° C werden zu einer Lösung von 800 mg (1,2 mMol) αααα $H_2TPP(NH_2)_4$ (vgl. B. 3.1.3.) in 200 ml $CH_2Cl_2$ 0,8 ml Pyridin gegeben. Unter kräftigem Rühren werden dann 3,2 Äquivalente Pivaloylchlorid (464 mg ≙ 0,46 ml) gelöst in 10 ml $CH_2Cl_2$ über einen Zeitraum von 40 Minuten zugetropft. Die Reaktión wird mittels DC verfolgt.

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| αααα $H_2TPP(NH_2)_4$ | 0,02 |
| αααα $H_2TPP(NH_2)_3PIV$ | 0,20 |
| αααα $H_2TPP(NH_2)_2PIV_2$ | 0,52 |
| αααα $H_2TPP(NH_2)PIV_3$ | 0,65 |
| αααα $H_2TPP\ PIV_4$ | 0,68 |

Fließmittel $CHCl_3$/Ether 2/1

Wenn kein monosubstituiertes Produkt mehr nachzuweisen ist, wird etwa das Optimum für die Bildung des αααα $H_2TPP\ PIV_3\ NH_2$ erreicht und die Reaktion wird abgebrochen, indem man 200 ml 10 %-igen wässrigen Ammoniak zusetzt. Anschließend wird die organische Phase zwei mal mit $H_2O$ gewaschen und über $Na_2SO_4$ getrocknet.
Die Isolierung des αααα $H_2TPP\ PIV_3\ NH_2$ erfolgt über prep. Lc (vgl. B 5. und B. 2.3.1.)

Probenmenge: 280 mg in 9 ml Eluens
Laufmittel v/v: $CHCl_3/(C_2H_5)_2O$ 3/1
Flußrate ml/Min: 21
Säulendruck: 12 bar
Eluensdruck: 1.5 bar

stat. Phase: 250 g LiChroprep 25-40 µm
Detektor: UV, $\lambda$ = 550 nm
Retentionszeiten (Min)

| | |
|---|---|
| αααα $H_2TPP\ PIV_4$ | 23,7 |
| αααα $H_2TPP\ PIV_3\ NH_2$ | 24,2 |
| αααα $H_2TPP\ PIV_2\ (NH_2)_2$ | 27,0 |
| αααα $H_2TPP\ PIV\ (NH_2)_3$ | 30,9 |

vgl. Abbildung 25 B

Das ein- und zweifach substituierte Produkt kann entsprechend obiger Arbeitsvorschrift erneut mit Pivaloylchlorid umgesetzt werden.
Die dreifach substituierte Verbindung enthält nach der prep. LC mit $CH_3Cl_3$/Ether 3:1 als Eluens noch ca. 15 % Picket-fence-Porphyrin.
Ausbeute: 65 % Gemisch

5.2.2. meso-Tri(ααα orthopivaloylamidophenyl)mono(β aminophenyl)porphyrin $H_2TPP(\alpha PIV_3)(\beta\ NH_2)$

2 g der Mischung aus αααα $H_2TPP(NH_2)PIV_3$ und αααα $H_2TPP\ PIV_4$ werden in 300 ml Chloroform gelöst und unter Stickstoff 5 h am Rückfluß gekocht. Die Reisomerisierung wird mittels DC verfolgt.

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| αααα $H_2TPP(NH_2)\ PIV_3$ | 0,19 |
| αααα $H_2TPP\ PIV_4$ | 0,31 |
| $H_2TPP\ (\beta NH_2)\ (\alpha PIV)_3$ | 0,40 |

Fließmittel Benzol/Ether 2:1

Anschließend wird die Lösung eingeengt und auf der prep. LC Apparatur getrennt (vgl. B 5. und B. 2.3.1.)

Probenmenge: 350 mg in 10 ml Eluens
Laufmittel v/v: $C_6H_6/(C_2H_5)_2O$ = 2/1
Flußrate ml/Min: 23
Säulendruck: 9,5 bar
Eluensdruck: 4 bar
stat. Phase: 250 g LiChroprep 25-40 µm
Detektor: UV, = 550 nm
Retentionszeiten (Min)

| | |
|---|---|
| αααα $H_2$TPP $PIV_3$ $(NH_2)$ | 42,3 |
| αααα $H_2$TPP $PIV_4$ | 38,2 |
| $H_2$TPP$(\alpha PIV)_3(\beta NH_2)$ | 31,7 |

Elementaranalysen: αααα $H_2$TPP $PIV_3$ $(NH_2)$

| | | | |
|---|---|---|---|
| ber.: | C 83.0 % | H 7.23 % | N 12.09 % |
| gef.: | C 81.5 % | H 7.1 % | N 11.9 % |

$H_2$TPP $(\alpha PIV)_3$ β $(NH_2)$

| | | | |
|---|---|---|---|
| ber.: | C 83.0 % | H 7.23 % | N 12.09 % |
| gef.: | C 81.9 % | H 7.45 % | N 12.3 % |

Die $^1$H-NMR Spektren der beiden Isomere unterscheiden sich nur unerheblich. δ(ppm) = 8,6-8,98 (m, 8H, β-Pyrrol), 7,3-7,9 (m, 16H, Phenyl), 3,7 (S, 2H, $-NH_2$), 0,19 (S, 18H, t-Butyl), 0,09 (S, 9H, t-Butyl), - 2,6 (S, 2H, innere NH).

5.2.3. meso-Tri(ααα-orthopivaloylamidophenyl)-mono(β-orthometoxysuccinylamidophenyl)porphyrin
$H_2$TPP $(\alpha PIV)_3$ (β Suc-OMe)

Zu einer Lösung von 0,95 g (≙ 1,02 mMol) $H_2$TPP $(\alpha PIV)_3$ $(\beta NH_2)$ in 100 ml $CHCl_3$ gibt man 0,8 ml Pyridin. Unter kräftigem Rühren werden dann 0,3 g bzw. 0,25 ml (≙ 2 mMol) Bernsteinsäuremonomethylestermonochlorid in 10 ml $CHCl_3$ im Verlauf von 20 Min zugetropft. Anschließend rührt man noch 2 Stunden und wäscht dann mit 100 ml 10 %-igem wässrigem Ammoniak.

Nach zweimaligem Waschen mit je 100 ml $H_2O$ wird die Lösung über $Na_2SO_4$ getrocknet.

Die Aufarbeitung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel Si60 mit $CHCl_3$/Ether = 6/1 als Laufmittel. (Säule: Ø 2 cm, Länge 30 cm).

| Substanz | $R_f$ |
|---|---|
| $H_2$TPP ($\alpha$PIV)$_3$ ($\beta NH_2$) | 0,55 |
| $H_2$TPP ($\alpha$PIV)$_3$ ($\beta$-Suc-OMe) | 0,40 |

Fließmittel $CHCl_3$/Ether = 4/1

Ausbeute: 81 %
Elementaranalyse: ber.: C 79.68 % H 7.12 % N 10.87 %
gef.: C 77.7 % H 7.4 % N 11.1 %

$^1$H-NMR Spektrum ($CDCl_3$), $\delta$(ppm) = 8,9-8,5 (m, 8H, $\beta$-Pyrrol), 7,1-7,9 (m, 16H, Phenyl), 3,7 (S, 3H, $-OCH_3$), 2,05 u. 1,6 je (T, 2H, $-CH_2-$), 0,12 (S, 18H, t-Butyl), 0,09 (S, 9H, t-Butyl), -2,65 (S, 2H, innere NH)

5.2.3.1. Bromo[meso-tri($\alpha\alpha\alpha$-orthopivaloylamidophenyl)-mono($\beta$-orthomethoxysuccinylamidophenyl)-porphyrin]Eisen III
Fe[TPP($\alpha$PIV)$_3$($\beta$-Suc-OMe)]Br

Der Eiseneinbau wird analog C. 2.8. vorgenommen.

Ausbeute: 48 %
UV: (508, 418 nm)

5.2.3.2. Verseifung des Fe[TPP($\alpha$PIV)$_3$($\beta$SucOMe)]Br

Die Verseifung wird in Dioxan/2 nNaOH 2/1 durchgeführt. Nach 3 h Rühren wird neutralisiert, einrotiert, in $CHCl_3$ aufgenommen und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Nach dem Filtrieren wird eingeengt und über Kieselgel Si60 chromatographiert (Laufmittel: $CHCl_3$/MeOH ≙ 5/1, Säule: Ø 2 cm, Länge 30 cm).

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| Fe[TPP(αPIV)$_3$(β-Suc-OMe)]Br | 0,63 |
| Fe[TPP(αPIV)$_3$(β-Suc-OH)]Br | 0,39 |

Fließmittel $CHCl_3$/MeOH = 5/1

Ausbeute: 78 %

5.2.4. meso-Tri(ααα-orthopivaloylamidophenyl)-mono (β-orthotrifluoracetyl-β-alanylamidophenyl) porphyrin $H_2$TPP (αPIV)$_3$(β-TFA-βAla)

Zu einer Lösung von 0,95 g (≙ 1,02 mMol) $H_2$TPP(αPIV$_3$)(β$NH_2$) in 100 ml $CHCl_3$ tropft man eine Lösung von 0,35 g (≙ 0,2 mMol) TFA-βAla-Cl in 10 ml $CHCl_3$. Dies geschieht so langsam, daß keine Grünfärbung auftritt. Anschließend wird das meiste bei der Reaktion entstehende HCl-Gas durch Anlegen von Vakuum abgezogen. Nach 2-stündigem Rühren wird ein Tropfen Pyridin zugegeben und überschüssiges TFA-βAla-Cl hydrolysiert, indem mit Wasser, 5 %-iger Zitronensäure und wieder mit Wasser gewaschen wird. Schließlich wird die organische Phase über $Na_2SO_4$ getrocknet, nach dem Abfiltrieren eingeengt und über Kieselgel Si60 chromatographiert (Laufmittel: $CHCl_3$/Ether 3:1), Säule: Ø 2 cm, Länge 30 cm).

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| Fe[TPP(αPIV)$_3$(βTFA-βAla) | 0,22 |
| Fe[TPP(αPIV$_3$)(β$NH_2$) | 0,35 |
| (Fe[TPP(αPIV)$_3$(β-β-Ala) | 0,5) |

Ausbeute: 68,5 %

5.2.4.1. Bromo[meso-Tri(ααα-orthopivaloylamidophenyl)-mono(β-orthotrifluoracetyl-βalanylamidophenyl)porphyrin)Eisen III
$Fe[TPP(\alpha PIV)_3(\beta\text{-TFA-}\beta Ala)]Br$

Der Eiseneinbau erfolgt analog C. 2.8.

Ausbeute: 58 %
UV: (509, 417 nm)

5.2.4.2. Abspaltung der TFA-Schutzgruppe von
$Fe[TPP(\alpha PIV)_3(\beta\text{-TFA-}\beta Ala)]$

Die alkalische Abspaltung der TFA-Gruppe erfolgt analog C. 5.2.3.2.
Die Säulenchromatographie über Kieselgel SI60 (Säule: Ø 2 cm, Länge 30 cm), wird mit Chloroform/Ether ≙ 3/1 durchgeführt.

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| $Fe[TPP(\alpha PIV)_3(\beta\text{-TFA-}\beta Ala)]Br$ | 0,22 |
| $Fe[TPP(\alpha PIV)_3(\beta\text{-}\beta\text{-Ala})]Br$ | 0,5 |

Ausbeute: 35 %
UV: ( 510 , 419 nm)

## 6. Kupplung histidinhaltiger Liganden an "tailed picket-fence"-Porphyrine

### 6.1. Kupplung von H-His(TRT)-OMe XHCl an Fe[TPP(αPIV)$_3$(βSuc-OH)]Br

200 mg (0,12 mMol) Fe[([TPP(αPIV)$_3$(βSuc-OH)]Br werden bei 2° C in 15 ml $CH_2Cl_2$ gelöst, mit 70 mg ( 0,25 mMol) Pentachlorphenol versetzt und nach Zugabe von 0,125 ml einer 2 molaren DCCI-Lösung in $CH_2Cl_2$ über Nacht gerührt.

Nach dem Abfiltrieren werden 115 mg (≙ 0,25 mMol) H-His(TRT)-OMe X HCl und 30 ml ( 0,25 mMol) Lutidin hinzugegeben. Nach 48-stündigem Rühren wird die Lösung erst mit 0,1 n Salzsäure gewaschen, dann mit 5 %-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Schließlich wird mit Wasser gewaschen und die organische Phase über $Na_2SO_4$ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren wird eingeengt und über Kieselgel Si60 (Säule: Ø 2 cm, Länge 25 cm) chromatographiert (Eluens $CHCl_3$/Ether ≙ 3/1).

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| Fe[TPP(αPIV)$_3$(βSucOH)]Br | 0,39 |
| Fe[TPP(αPIV)$_3$(βSuc-HIS(TRT)-OMe)]Br | 0,57 |

Fließmittel: $CHCl_3$/MeOH ≙ 5/1

Ausbeute: 81 %

UV-Spektrum: vgl. Abbildung 31

6.1.1. Verseifung des Methylesters bei Fe[TPP(αPIV)$_3$-(βSuc HIS(TRT)-OMe)]Br

Die Verseifung erfolgt analog C. 5.2.3.2.

| Substanz | $R_f$-Wert |
|---|---|
| Fe[TPP(αPIV)$_3$ βSuc His(TRT)-OMe)]Br | 0,57 |
| Fe[TPP(αPIV)$_3$ βSuc His(TRT)-OH)]Br | 0,42 |

Fließmittel $CHCl_3$/MeOH = 5/1

Ausbeute: 85 %

6.1.2. Abspaltung der Tritylgruppe (135)

Die Abspaltung der Tritylgruppe erfolgt durch Übergießen der festen Verbindung mit TFA und anschließendem Rühren, oder in Lösung von $CH_2Cl_2$ durch Zusatz von TFA und Anisol. In beiden Fällen wird das Porphyrin aus $CH_2Cl_2$/Heptan umkristallisiert.
Die Abspaltung der Tritylgruppe soll immer als letzter Schritt der Synthese erfolgen, da gleichzeitig eventuell vorhandenes μ-oxo-Dimeres zerstört wird. Bei Dextran-und albumingebundenen Proben ist dies allerdings nicht möglich.

## 7. Solubilisierung von Porphyrinsystemen durch Komplexierung

Eine Solubilisierung von Eisenporphyrinen durch CTAB oder Albumin ist möglich, indem feinpulverisiertes Eisenporphyrin über mehrere Tage hinweg in einer Lösung von CTAB oder Albumin suspendiert und überschüssiges Porphyrin anschließend abfiltriert wird.

Eine bessere und schnellere Solubilisierung erfolgt in homogener Phase (Dioxan/$H_2O$) nach den folgenden Vorschriften.

## 7.1. Komplexierung durch Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Das Eisenporphyrinsystem (ca. 50 mg) wird in 25 ml $CH_2Cl_2$ gelöst und nach Zugabe von 0,5 ml konz. HBr wird 10 Min. kräftig gerührt. Anschließend wird über $Na_2SO_4$ getrocknet. Nach dem Abfiltrieren werden 10 ml Dioxan hinzugegeben und mit der entsprechenden Menge Ligand versetzt. Dann wird das $CH_2Cl_2$ am Rotationsverdampfer abgezogen.

Die Lösung des Eisenporphyrins in Dioxan wird dann zu 100 ml einer 2 %-igen wässrigen CTAB-Lösung getropft. Nach 1-3-stündigem Rühren wird die Lösung so stark eingeengt, daß sie frei von Dioxan ist und erneut mit $H_2O$ auf 100 ml verdünnt. Nach dem Filtrieren wird auf die für UV-Messungen notwendige Porphyrinkonzentration (1-5 x $10^{-5}$ Mol/l) verdünnt. (vgl. Spektrum Abbildung 21)

## 7.2. Komplexierung durch Albumin (132-134)

### 7.2.1. Vorbereitung des Albumins

Eine 25 %-ige Lösung von Humanserumalbumin wird unter Volumenkonstanz über eine Polysulfonmembran (Ausschlußgrenze: MG = 3000) mit $H_2O$ bei 4° C ultrafiltriert. Dabei werden die zugesetzten Stabilisatoren ausgewaschen.

Da das Albumin leicht denaturiert, müssen alle Geräte gründlich mit Isopropanol und Wasser (Bidest.) gespült werden.
Anschließend wird lyophilisiert oder das Albumin mit Aceton gefällt und im Hochvakuum getrocknet.

Ein einfacherer Weg besteht darin, das Humanserumalbumin mit Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Volumenkonstanz zu ultrafiltrieren und die Lösung direkt einzusetzen. Aller-

dings ist diese Lösung bei 4° C nur wenige Stunden stabil.

Rinderalbumin wird ohne Aufarbeitung direkt eingesetzt.

7.2.2. Komplexierung von Eisenporphyrinen durch Albumin

Für eine Komplexierung von etwa 2 Eisenporphyrinen pro Albumin werden ca. 10 mg Porphyrin nach C. 7.1. behandelt und die Lösung in Dioxan (2 ml) zu einer nach C. 7.2.1. vorbereiteten Lösung von ca. 0,3 g Albumin getropft und über Nacht bei 4° C gerührt.

Anschließend wird filtriert, der Albumin-Eisen-Porphyrinkomplex mit Aceton gefällt und mit Ether gewaschen.
Ebenso kann die Lösung nach der Filtration lyophilisiert werden.
Beladung pro Albumin: 1-3 ("picket-fence"-Porphyrinmoleküle)

## 8. Polymer- oder albumingebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin

### 8.1. Dextrangebundenes "tailed picket-fence"-Poyrphyrin

50 mg (≙ 0,03 mMol) Fe[TPP(αPIV)$_3$(β-Suc-His-OH)]Br werden in 20 ml DMSO gelöst und mit einer äquimolaren Menge Chlorameisensäureethylester versetzt. Nach Zugabe von 2 Tropfen N-Methylmorpholin wird 30 Minuten gerührt.

Anschließend werden 100 mg ($2{,}2 \times 10^{-3}$ mMol) Aminodextran (C. 4.1.2.) zugegeben und 48 Stunden gerührt. Das dextrangebundene Porphyrin wird mit 20 ml Ethanol gefällt, abgesaugt und gründlich mit Ether gewaschen.

Ausbeute: 100 % (bezogen auf Porphyrin)
Beladung der Aminogruppen: 92 %

## 8.2. PEG-gebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin

50 mg (0,03 mMol) Fe[TPP(αPIV)$_3$(βSuc-His(TRT)-OH)]Br werden in 10 ml $CH_2Cl_2$ gelöst und bei 2-3° C mit 0,05 mMol Trichloracetylpentachlorphenylester versetzt. Nach Zugabe von 0,05 ml Triethylamin wird 2 Stunden gerührt und filtriert.

Anschließend wird bei Raumtemperatur mit 0,2 g (0,02 mMol) H-Leu-Gly-PEG$_{5000}$)$_2$ x 2 HCl versetzt und 0,1 ml N-Methylmorpholin zugegeben.

Nach vier Tagen Rühren wird mit Ether gefällt und nochmals aus $CH_2Cl_2$/Ether umgefällt.
Beladung: 76 % UV-Spektren: vgl. Abbildung 30

## 8.3. Albumingebundenes "tailed picket-fence"-Porphyrin

50 mg (0,03 mMol) Fe[TPP(αPIV)$_3$ (β-Suc-His-OH)]Br werden in 10 ml Dioxan gelöst und bei 2° C mit 0,05 mMol Trichloracetylpentachlophenylester versetzt. Nach Zugabe von 0,05 ml Triethylamin (TEA) wird zwei Stunden gerührt und filtriert.

Zu einer Lösung von 1,5 g Albumin in 20 ml Wasser und 0,05 ml Triethylamin wird die Lösung des Aktivesters getropft und 48 Stunden bei 4° C gerührt.

Anschließend wird filtriert und das Albuminporphyrin mit Aceton gefällt und im Hochvakuum getrocknet.
Beladung: 1,2 - 1,8 Porphyrineinheiten pro Albumin.
UV-Spektren: vgl. Abbildung 32, 33, 34

## D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese orthosubstituierter Tetraphenylporphyrine als Modellsubstanzen für Hämoglobin und Myoglobin wird beschrieben. Dabei auftretende Atropisomere werden durch präparative HPLC getrennt und über $^{1}$H-NMR-Spektroskopie identifiziert. Die Rotationsbarrieren für die ortho-R-Phenyl-Rotation an meso-Tetraphenylporphyrinderivaten werden bestimmt und die Umwandlung der einzelnen Atropisomere in ihre Mischung wird durch $^{1}$H-NMR Spektroskopie verfolgt.

Die Reaktion von sterisch gehinderten Porphyrinsystemen mit Sauerstoff und Kohlenmonoxid wird am Beispiel des "picket-fence"-Porphyrins in Abhängigkeit von verschiedenen Liganden, der Konzentration und vom Lösungsmittel untersucht.

Daraus wird die Notwendigkeit zur Synthese eines sterisch gehinderten Porphyrinsystems mit kovalent gebundenem Liganden abgeleitet ("tailed picket-fence"-Porphyrin), das auch in wässriger Lösung als Modellsubstanz für Hb und Mb dienen soll.

Die Synthese, Atropisomerisierung und Identifizierung von "tailed picket-fence"-Porphyrinen wird eingehend untersucht und diskutiert.

Die Möglichkeiten zur Solubilisierung und das Oxygenierungsverhalten von "picket-fence"-Porphyrinen in wässriger Lösung werden vorgestellt.

Das Oxygenierungsverhalten von an Dextran , Polyethylenglykol oder Albumin gebundenen "tailed picket-fence"-Porphyrinen in wässriger Lösung wird diskutiert.

Eine Apparatur zur präparativen HPLC wird vorgestellt. Ihre Funktionsweise wird beschrieben, und die Vorteile

einer axialen Kompression der stationären Phase werden erläutert. Die Qualität der Säule bei Verwendung von Kieselgel und RP 18-Material als stationäre Phase wird bestimmt.

## E. LITERATURVERZEICHNIS


1) Isao Yamazaki in
Molecular Mechanisms of Oxygen Activation,
Osamu Hayaishi ed. Academic Press, N.Y. 1974

2) A.B.P. Lever und H.B. Gray ed.,
Iron Porphyrines I, Addison-Wesley Publishing
Company, Inc., London 1983

3) M.F. Perutz,
Spektrum der Wissenschaft, Internat. Ausgabe 2,
19(1979)

4) A.R. Battersby, K. Frobel,
Chi. u. Z. 16, 124 (1982)

5) E. Antonini, E. Chiancone,
Ann.Rev.Biophys. 6, 239 (1977)

6) M.F. Perutz,
Nature 228, 726 (1970)

7) P. Karlson,
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Thieme, Stuttgart 1980

8) G.S. Adair, J. Barcroft und A.V. Bock,
J.Physiol. 55, 332 (1921)

9) M.F. Perutz,
Ann.Rev.Biochem. 48, 327 (1979)
K. Imai,
J.Mol.Biol. 133, 233 (1979)
K.C. Cho, J.J. Hopfield,
Biochemistry 18, 5826 (1979)

10) A. Arnone,
Nature 237, 146 (1972)

11) R. Benesch, R.E. Benesch,
Nature 221, 618 (1969)

12) J. Tyuma, K. Shimizu,
Arch.Biochem.Biophys. 129, 404 (1969)

13) J.V. Kilmartin, L. Rossi-Bernardi,
Physiol.Rev. 53, 836 (1973)

14) R. Sazaki, K. Ikura, H. Narita, S. Yanagawa, H. Chiba,
TIBS - April 1982, S. 140

15) J.P. Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 97, 1427 (1975)

16) J.P. Collman et al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 564 (1978)

17) J.P. Collman et al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 1052 (1978)

18) C.K. Chang,
J.Amer.Chem.Soc. 99, 2820 (1977)

19) A.R. Battersby et al.,
J.Chem.Soc., Chem.Commun. 1976, 879

20) C.K. Chang, T.G. Traylor,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 2647 (1973)

21) C.K. Chang, T.G. Traylor,
J.Amer.Chem.Soc. 95, 5810 (1973)

22) J.H. Wang,
J.Amer.Chem.Soc. 80, 3168 (1958)

23) J.H. Wang,
Acc.Chem.Res. 3, 90 (1970)

24) O. Leal, D.L. Anderson, R.G. Bowmann, F. Basolo,
R.L. Burwell jr.,
J.Amer.Chem.Soc. 97, 5125 (1975)

25) F.S. Molinoro, R.G. Little, J.A. Ibers,
J.Amer.Chem.Soc. 99, 5628 (1977)

26) V.S. Sharma, J.F. Geibel, H.M. Ramney,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 3747 (1978)

27) J. Geibel, J. Cannon, D. Compbell, T.G. Traylor,
J.Amer.Chem.Soc. 100, 3575 (1978)

28) F. Basolo, B.M. Hofmann, J.A. Ibers,
Acc.Chem.Res. 8, 384 (1975)

29) F. Basolo et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 97, 5125 (1975)

30) J.E. Balwin, T. Klose, M. Peters,
J.Chem.Soc. Chem.Commun. 1975, 881

31) Z. Yoshida,
Pure and Appl.Chem. 53, 293 (1981)

32) J.W. Buchler,
Angew.Chem. 90, 425 (1978)

33) E. Bayer, P. Schretzmann,
Structure and bonding Vol. 2, 181 (1967)
Springer Verlag

34) A.H. Corwin, S.D. Bruck,
J.Amer.Chem.Soc. 80, 4736 (1958)

35) H. Ledon, Y. Brigandat,
J.Organomet.Chem. 190, C87 (1980)

36) K. Honda, S. Hata, E. Tsuchida,
Bulletin of the Chemical Society of Japan 49, 868 (1976)

37) J. Almog, J.E.Baldwin, R. Dyer, J. Huff, C.J. Wilkinson,
J.Amer.Chem.Soc. 97, 226 (1975)

38) E. Tsuchida, E. Hasegawa, T. Hanayama,
Macromolecules 11, 947 (1978)

39) K. Shigehara, K. Shinohara, Y. Sato, E. Tsuchida,
Macromolecules 14, 1153 (1981)

40) H. Nishide, K. Shinohara, E. Tsuchida,
Journal of Polymer Science; Polymer Chemistry
Edition 19, 1109 (1981)

41) E. Tsuchida, H. Nishide, Y. Sato,
J.Chem.Soc.Chem.Commun. 1982, 556

42) Ch. Homann,
Dissertation Universität Tübingen (1979)

43) E. Tsuchida, H. Nishide,
Adv. in Polymer Science 24, 1-87 (1978)

44) E. Tsuchida, E. Hasegawa, K. Honda,
Biochem.Biophys. Acta 427, 520 (1976)

45) H. Nishidi, H. Ohno, E. Tsuchida,
Macromol.Chem. Rapid Comm. 2, 55 (1981)

46) J.-H. Fuhrhop, S. Besecke, W. Vogt, J. Ernst,
J. Subramanian,
Makromol.Chem. 178, 1621 (1976)

47) W.J. White in The Porphyrins, Vol. V S. 303 ff.
herausgegeben von D. Dolphin,
Academic Press, New York (1978)

48) L.K. Gottwald, E.F. Ullmann,
Tetrahedron Lett. 3071 (1969)

49) J.P. Collman, C.A. Reed,
J.Amer.Chem.Soc. 95, 2048 (1973)

50) Diplomarbeit H.-P. Seelmann-Eggebert,
Universität Tübingen (1980)

51) J.P. Collman et.al.,
J.Amer.Chem.Soc. 95, 7868 (1973)

52) E. Bayer, H.-P. Seelmann-Eggebert, K. Shinohara u.
K. Albert,
Manuskript in Vorbereitung

53) Dissertation M. Schleinzer,
Universität Tübingen (1982)

54) J. Cohen, W. Coughey,
Biochemistry 7, 636 (1968)

55) C.E. Castro in The Porphyrins Vol. V, 31 ff.
herausgeg. von D. Dolphin, Academic Press, New York

56) D.H. Chin, G.N.La Mar, A.L. Batch,
J.Amer.Chem.Soc. 102, 4344 (1980)

57) D.H. Chin, J.D. Gaudio, G.N. La Mar, A.L. Balch,
J.Amer.Chem.Soc. 99, 5486 (1977)

58) L. Vaska et al.,
Finn.Chem.Lett. 2, 66 (1974)

59) A.R. Amunddsen u. L. Vaska,
Inorg.Chem.Acta 14, L 49(1975)

60) R.L. Balch, G.N. La Mar et al.
J.Amer.Chem.Soc. 104, 5992 (1982)

61) M.M.L. Chu, C.E. Castro, G.M. Hathanway,
Biochemistry 17, 481 (1978)

62) T.G. Traylor, J. Geibel, J. Cannon, C. Campbell,
J.Amer.Chem.Soc. 100, 3575 (1978)

63) T.G. Traylor et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 101, 5376 (1979)

64) W.S. Caughey,
A.Rev.Biochm. 36, 611 (1967)

65) A. Warshal,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 1789 (1977)

66) K. Shinohara,
unveröffentlichte Ergebnisse

67) J.W. Buchler, W. Kokisch, P.P. Smith,
Structure and Bonding 34, 79 (1978)

68) B.A. Wittenberg, P.W. Bruhl u. J.B. Wittenberg,
Biochem.J. 91, 363 (1965)

69) L. Pauling,
Nature 203, 182 (1964)

70) C.K. Chang, T.G. Traylor,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 1166 (1975)

71) M. Momenteau, D. Lavalette, J. Mispelter und
J.M. Lhoste,
Inorg.Chim.Acta 79, 100 (1983)

72) J.P. Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 105, 3052 (1983)

73) J.P. Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 105, 3038 (1983)

74) E.J. Heidner, R.C. Ladner, M.F. Perutz,
J.Mol.Biol. 104,707 (1976)

75) J.C. Norvell, A.C. Nunes, B.P. Schoenhorn,
Science 190, 568 (1975)

76) R. Huber, O. Epp, H.J. Formanek,
J.Mol.Biol 52, 349 (1970)

77) E.A. Padlan, W.E. Love,
J.Biol.Chem. 249, 4067 (1975)

78) H.A. Sober,
Handbook of Biochemistry pJ-175 Chemical Rubber
Publishing Co., Cleveland, OHIO

79) J.P. Collman et al.,
Inorg.Chim.Acta 79, 101 (1983)

80) T. Minceyund T.G. Traylor,
Bioinorg.Chem. 9, 409 (1978)

81) G.A. Moehring, Amy H. Chu, L. Kurlansik u. T.J. Williams,
Biochem. 1983, 3381 (1983)

82) T.G. Traylor et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 101, 6716 (1979)

83) T.G. Traylor,
Acc.Chem.Res. 1981, 102 (1981)

84) J.S. Valentine, R.P. Sheridan, L.C. Allen, P.C. Kahn
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 1009 (1979)

85) J.P. Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc. 102, 4182 (1980)

86) D. Brault und M. Rougee,
Biochem.Biophys.Com. 57, 654 (1974)

87) E. Hasegawa, E. Tsuchida et al.,
Biochem.Biophys.Res.Com. 105, 1416 (1982)

88) E. Tsuchida, E. Hasegawa et al.,
Biochem.Biophys.Res.Com. 105, 1416 (1982)

89) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yua Sa u. M. Sekine,
Chemistry Letters (Japan) 473 (1983)

90) E. Tsuchida et al.,
Biochem.Biophys.Res.Commun. 109, 858 (1982)

91) R. Wehrli,
Z.Anal.Chem. 277, 289 (1975)

92) E. Godbille und P. Devaux,
J.Chromatographic Science 12, 564 (1974)

93) F.W. Karasek,
Research Development 28, 32 (1977)

94) K. Zineker, G.J.T.
Fachz. Lab. 20, 821 (1976)

95) Th. Butters,
Dissertation Universität Tübingen (1983)

96) W. Stüber,
Dissertation Universität Tübingen (1983)

97) R. Häbich,
Dissertation Universität Tübingen in Vorbereitung

98) Firmenschrift INSTRUMENTS SA, DIVISION JOBIN-YVON
Application, Notes Booklet Nr. 1

99) E. Bayer und J. Reiners,
unveröffentlicht

100) A. Treibs, N. Häberle,
Liebigs Ann.Chem. 718, 183 (1968)

101) G. Holzbach,
Dissertation Universität Tübingen (1977)

102) G. Gaßmann,
Dissertation Universität Tübingen (1973)

103) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften,
Berlin 1972 und Firmenschrift der Fa. Merck:
"Trocknen im Labor"

104) D.D. Perrin u. W.L.F. Armarego,
Purification of laboratory chemicals,
Pergamon, Oxford 1980

105) Nachr.Chem.Techn. 16, 260 (1968)

106) A. Felix, M.H. Jiminez,
J.Chromatogr. 84, 361 (1974)

107) Firmenschrift Merck (Darmstadt):
Anfärbereagenzien für die DC

108) M.R. Grimmett, E.L. Richards.
J.Chromatog. 20, 171 (1965)

109) N.C. Davis,
J.Biol.Chem., 223, 935 (1956)

110) L. Zervas,
J.Amer.Chem.Soc. 81, 2884 (1959)

111) M.Bergman, L. Zervas,
Chem.Ber. 65, 1192 (1932) ibid
J.Biol.Chem. 115, 593 (1936)

112) G. Hillmann,
Z. Naturforschung 1, 682 (1964)

113) E. Boccu, R. Largajolli und F.M. Veronese,
Z.Naturforschung 38c, 94 (1983)

114) R. Schwyzer et al.,
Patentschrift Nr. 1125942, 1962 CIBA (Basel)

115) G.M. Bonora, C. Toniolo,
Makromol.Chem. 180, 2095 (1979)

116) M. Muramatu, R. Hirchata, Y. Kanada, S. Shihuya,
Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 332, 271 (1963)

117) G. Charlot, Colorimetric Determination of Elements,
S. 274, Elsevier Publishing Company,
Amsterdam, London, New York (1964)

118) B.F. Cameron,
Analytical Biochemistry 35, 515 (1970)

119) M. Keck,
Diplomarbeit Universität Tübingen (1981)

120) E.A. Kuznetsova, L.S. Shishkanova, G.E. Koroleva,
E.D. Sinyagina, V.M. Shlimak und A.E. Vasil'ev,
J.Gen.Chem. USSR 48, 1292 (1978)

121) E. Schnabel,
Ann.Chem. 702, 188 (1967)

122) L. Carpino,
J.Amer.Chem.Soc. 81, 855 (1959)

123) M. Brenner, H.R. Müller und W. Pfister,
Helv.Chim.Acta 36, 1109 (1953)

124) H. Hagenmaier, H. Frank,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 253, 1973 (1972)

125) H. Mutter,
Dissertation Universität Tübingen (1977)

126) E. Bayer, J. Gatfield, H. Mutter, M. Mutter,
Tetrahedron 34, 1829 (1978)

127) M. Fujino, C. Hatanaka,
Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) 16, 929 (1968)

128) J. Kovacs, M.Q. Ceprini, C.A. Dupraz und G.N. Schmitt,
J.Org.Chem. 32, 3696 (1967)

129) S. Sakakibara u. N. Inukai,
Bull.Chem.Soc.Japan 38, 1979 (1965)

130) F. Weygand und R. Geiger,
Chem.Ber. 89, 647 (1956)

131) E.F. Schallenberg und M. Calvin,
J.Amer.Chem.Soc. 77

132) G.E. Means, P.E. Feeney,
Chemical modification of proteins,
Holden-Day Inc.,(1971)

133) A.N. Glazer, R.J. De Lange and D.S. Sigman,
Chemical modifications of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures.
North-Holland Publ., Amsterdam (1975)

134) F.W. Putnam,
the proteins Vol. II 3rd edition edited by H. Neurath,
Academic press, New York (1976)

135) R. Schwyzer u. P. Sieber,
Helv.Chem.Acta 40, 624 (1957), ibid
41 1582, 2186 (1958)

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, M. Baumann, W. Braun, E. Breitmaier, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, P. Krauß, D. Krug, U. Kunze. E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Meier, Eu. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, H. Schott, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Straub, H. Suhr, W. Voelter, W. Winter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Hans-Peter Seelmann-Eggebert

| | |
|---|---|
| 25.09.1952 | geboren in Buenos-Aires als Sohn des Chemikers Prof. Dr. W. Seelmann-Eggebert und seiner Ehefrau Rosemarie, geborene Dihrberg. |
| 1959 - 63 | Volksschule in Unteruhldingen/Bodensee |
| 1963 - 72 | Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Überlingen/Bodensee |
| Juni 1972 | Abitur |
| Oktober 1972 | Aufnahme des Chemiestudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| April 1976 | Vordiplom Chemie |
| Juli 1979 | mündliche Hauptdiplomprüfung Chemie |
| September 1979 - Juni 1980 | Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. E. Bayer: "Picket-fence"-Porphyrin als Grundlage eines polymergebundenen Hämoglobinmodells |
| Juni 1980 | Diplom |
| Juli 1980 - Juli 1983 | Experimenteller Teil der Dissertation: "Synthese, Charakterisierung und Solubilisierung von Porphyrinsystemen " am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer. |
| Seit August 1981 | Assistent im organischen Praktikum für Diplomchemiker. |

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 07121/45377